

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke)

**Prädiktion der Delayed Graft Function-
Genetische Untersuchungen
des Erythropoietinrezeptors**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades
der Medizin an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt
von Sascha Friedrich
aus Erfurt
2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Fischereider

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Holger Schmid
Priv. Doz. Dr. med. Stephan Lederer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. habil. Peter Lohse

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.05.2016

meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Nierentransplantation	1
1.1.1	Allgemeines	1
1.1.2	Möglichkeiten der Organrekrutierung	3
1.1.3	Komplikationen der Nierentransplantation	4
1.2	Delayed Graft Function	5
1.2.1	Definition	5
1.2.2	Pathophysiologie der DGF	6
1.2.2.1	Ischämie Reperfusionsschaden	6
1.2.3	Risikofaktoren für das Auftreten einer Delayed Graft Function	9
1.2.3.1	Faktoren des Transplantationsablaufes	9
1.2.3.1.1	Die kalte Ischämiezeit (cold ischaemia time, CIT)	9
1.2.3.1.2	Reanastomisierungszeit	10
1.2.3.1.3	Organkonservierung	10
1.2.3.2	Risikofaktoren seitens des Spenders	11
1.2.3.3	Risikofaktoren seitens des Empfängers	11
1.2.3.4	Genetische Aspekte der DGF	13
1.2.3.5	Immunologische Faktoren	14
1.2.4	Auswirkungen der DGF auf die Langzeitfunktion	14
1.2.5	DGF Prognose Score	15
1.2.6	Strategien zur Prävention einer DGF	16
1.3	Erythropoietin	17
1.3.1	Allgemeines	17
1.3.1.1	Regulation der Sekretion	17
1.3.1.2	Erythropoietin Rezeptor	18
1.3.1.3	Wirkungsweise von EPO	20
1.3.2	Effekte von Erythropoietin in nicht hämatopoetischen Geweben	22
1.3.2.1	Renale Effekte von EPO	23
1.3.2.2	Nervensystem	25
1.3.2.3	Herz	26
1.3.2.4	Leber	27
1.3.2.5	Endothel	27
1.3.2.6	Ischämische Präkonditionierung	28
1.3.3	Veränderungen im Gen des EPO Rezeptors	28
1.3.4	Anwendung von Erythropoietin	30
1.3.4.1	Klinische Anwendung von Erythropoietin	30
1.3.4.2	EPO und EPOR im Leistungssport	31
1.3.5	Fragestellung	32
2	MATERIAL UND METHODEN	33
2.1	Patientenkollektiv	33
2.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	33
2.2.1	Polymerase Ketten Reaktion (PCR; polymerase chain reaction)	33

2.2.1.1	Prinzip	34
2.2.1.2	Standard PCR Protokoll	35
2.2.1.3	PCR Bedingungen	36
2.2.1.4	Oligonukleotid Primer	36
2.2.1.5	Agarose Gelelektrophorese	37
2.2.2	Isolierung von PCR Produkten	39
2.2.3	DNA Sequenzierung	39
2.2.3.1	Prinzip	39
2.2.3.2	DNA Sequenzreaktion	40
2.2.3.3	Reinigung der Sequenzreaktionsprodukte	41
2.2.4	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)	42
2.2.5	Ethanolpräzipitation der DNA	43
2.2.6	Verwendete Geräte und Substanzen	44
2.3	Statistik und Software	45
2.3.1	Statistik	45
2.3.2	Software	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	Klinische Daten	46
3.2	Genetische Untersuchungen	49
3.2.1	Untersuchung der Spender mit gutem Outcome	50
3.2.1.1	Mutation Gly46->Glu	50
3.2.1.2	Sequenzalignment	51
3.2.1.3	Abstandsmatrix	52
3.2.1.4	Position der Mutation innerhalb des Rezeptors	53
3.2.1.5	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)	54
3.2.1.6	Klinische Daten	56
3.2.1.7	Weiterführende Untersuchungen der Gly46->Glu Variante	59
3.2.1.7.1	Kontrollkollektiv	59
3.2.1.7.2	Thrombophiliekollektiv	60
3.2.1.8	Leistungssportler Kollektiv	61
3.2.2	Untersuchung der Spender mit schlechtem Outcome	62
3.2.2.1	Variation His161-> Arg	62
3.2.2.2	Sequenzalignment	63
3.2.2.3	Abstandsmatrix Exon 4	64
3.2.2.4	Position der Mutation innerhalb des Rezeptors	65
3.2.2.5	Restriktionfragmentlängenpolymorphismus	65
3.2.2.6	Klinische Daten	67
3.2.2.7	Untersuchungen an weiteren Kollektiven	68
3.2.2.7.1	Kontrollkollektiv	68
3.2.2.7.2	Untersuchung im Sportlerkollektiv	68
3.2.3	Sequenzierung der weiteren Exons und Introns	69
4	DISKUSSION	70
4.1	Allgemeines	70

4.2	Diskussion der Methodik	70
4.2.1	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	70
4.2.2	Kollektive	72
4.2.2.1	Transplantatspenderkollektiv	72
4.2.2.2	Sportlerkollektiv	74
4.2.3	EPOR als Kandidatengen	75
4.2.3.1	EPOR im Nierenspenderkollektiv	75
4.2.3.2	EPOR als Kandidatengen in der Untersuchung eines Sportlerkollektivs	78
4.3	Diskussion der experimentellen Ergebnisse	79
4.3.1	Exon 2 Nierenspenderkollektiv	79
4.3.2	Ergebnisse der Sportleruntersuchung	82
4.3.3	Andere Kollektive	82
4.3.4	Mutation Exon 4	83
4.4	Einbindung der gefundenen Mutationen in die Pathophysiologie der DGF	85
4.4.1	Inflammation	86
4.4.2	Einfluss auf das Endothel	87
4.4.3	Apoptose	89
4.4.4	HIF	92
4.5	Klinische Aspekte	93
5	ZUSAMMENFASSUNG	95
6	LITERATURVERZEICHNIS	96
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	114
8	TABELLENVERZEICHNIS	115
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	116
	LEBENS LAUF	119
	DANKSAGUNG	120
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	121

1 Einleitung

1.1 Nierentransplantation

1.1.1 Allgemeines

Die Nierentransplantation gilt mittlerweile als erfolgreichste und effizienteste Therapieoption des terminalen Nierenversagens. Die häufigsten Ursachen für das terminale Nierenversagen beim Erwachsenen stellen die diabetische Nephropathie und die verschiedenen Formen der Glomerulonephritiden dar. Weitere Ursachen sind interstitiellen Nephritiden, sowie die vaskulären Nephritiden. Seltener Ursachen stellen metabolische Störungen wie Oxalosen, toxische Schädigungen durch Analgetika sowie hereditäre Erkrankungen wie Zystennieren dar. Genannt werden müssen auch Nierenschädigungen im Rahmen von Kollagenosen wie dem Lupus Erythematodes, Goodpasture Syndrom, der Granulomatose mit Polyangiitis (früher Morbus Wegener) und sonstigen Vaskulitiden, sowie primäre oder sekundäre Amyloidosen. Durch das terminale Nierenversagen kommt es zu einem Symptomenkomplex der unter dem Begriff Urämie subsumiert wird.

Die Erstbehandlung einer chronischen Niereninsuffizienz stellt die klassische Dialysebehandlung in Form einer Hämo- oder Peritonealdialyse dar. In Deutschland wird die Hämodialyse mit 95 % der Peritonealdialyse vorgezogen. Aufgrund des Fehlens der inkretorischen Funktion der Niere stellen sich aber häufig Folgeerkrankungen wie eine renale Anämie, ein sekundärer Hyperparathyreoidismus mit Osteoporose, arterielle Hypertonie und Herzinsuffizienz ein.

Die Nierenersatztherapie setzt des Weiteren insbesondere durch den hohen Zeitaufwand und die beeinträchtigte Lebensqualität ein großes Maß an Patientencompliance voraus. Somit stellt die Nierentransplantation eine gute Alternative zur Dialysebehandlung dar. In ökonomischer Hinsicht übersteigen die Kosten für eine Dialyse ab dem fünften Jahr die Kosten nach einer Transplantation.

Als Kontraindikationen für eine Nierentransplantation gelten schwere nicht sanierbare Infektionen, metastasierende Malignomerkrankungen, fortschreitende kardiale und hepatische Erkrankungen.

Die heute durchgeführte Standardmethode ist die extraperitoneale Transplantation in die linke oder rechte Fossa Iliaca mit der einer End-zu-Seit-Anastomisierung der Arteria renalis an die Arteria Iliaca Communis oder Externa. Die Vena renalis wird End-zu-Seit an die Vena Iliaca Communis oder Externa anastomosiert. Danach wird eine Ureterozystoneostomie mit Antirefluxplastik vorgenommen (Tullius S.G. 2001).

Einen wichtigen Schritt zur Koordination der Transplantationen bildete der Zusammenschluss zur Organisation Eurotransplant 1967, der mittlerweile sieben europäische Staaten mit einer Gesamtbevölkerung von 120 Millionen angehören. Hierdurch konnte die Verteilung der Organe deutlich besser koordiniert werden.

Ende des Jahres 2009 standen bei Eurotransplant 10533 Patienten auf der aktiven Warteliste für eine Nierentransplantation. Die durchschnittliche Dauer in Deutschland bis zur Transplantation einer neuen Niere Ende 2009 betrug ca. 40 Monate. 2772 Patienten wurden im Jahre 2009 in Deutschland transplantiert. Die Zahl der auf eine Nierentransplantation wartenden Patienten lag bei über 8000 Patienten. Aufgrund der Organknappheit in Deutschland und Europa kommt der Nierenlebendspende eine große Bedeutung zu. Insgesamt 600 Nierenlebendspenden wurden 2009 in Deutschland durchgeführt, was einem Anteil von 21,2% der Gesamttransplantationen entspricht (DSO, Deutsche Stiftung Organtransplantation). Die Vorteile sind zum einen eine verbesserte Planbarkeit des operativen Eingriffs, eine mögliche vorzeitige Immunsuppression, und die Verringerung der kalten Ischämiezeit. In den letzten Jahren bis 2013 hat die Zahl der Nierentransplantationen deutlich abgenommen. So wurden 2013 nur noch 2272 Patienten transplantiert, wobei der Anteil an Lebendspenden zwar prozentual zunahm, es sich absolut aber ebenfalls eine Abnahme zeigte (DSO, Deutsche Stiftung Organtransplantation, Jahresbericht 2013).

Faktoren, welche von Eurotransplant bei der Vergabe von Organen berücksichtigt werden, sind unter anderem die Anzahl der übereinstimmenden HLA- Matches, die Wartezeit, die Entfernung zwischen Spender und Empfängerzentrum, die Import/ Export Bilanz der beteiligten Nationen, sowie die in einzelnen Fällen erhöhte Dringlichkeit zur Transplantation.

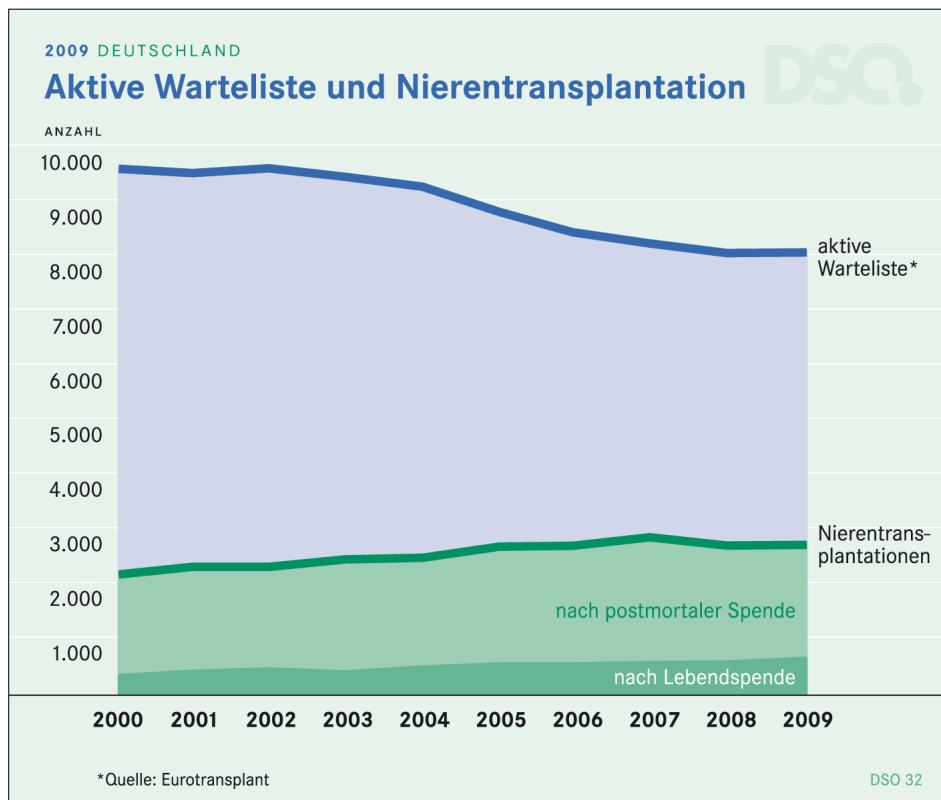


Abbildung 1: Aktive Warteliste und Nierentransplantation (Grafik DSO, Quelle Eurotransplant)

1.1.2 Möglichkeiten der Organrekrutierung

Die für die Transplantation benötigten Organe werden aus unterschiedlichen Quellen gewonnen. Die in Deutschland am häufigsten praktizierte Methode ist die Transplantation der Nieren hirntoter Spender.

Eine zweite Gruppe bilden die Lebendspender. Dabei bedient man sich der Eigenschaft der Niere als doppelt angelegtes Organ, bei Verlust einer Niere, die Funktion der anderen ohne Einfluss auf die Überlebenszeit zu übernehmen. Lebendspenden sind in Deutschland nur zwischen Verwandten ersten und zweiten Grades, Ehepartnern, Verlobten und sich emotional nahestehender Personen zugelassen. Dabei zeichnet sich die Lebendspende aufgrund des geringeren logistischen Aufwands, insbesondere den fehlenden Transportwegen und der damit verringerten kalten Ischämiezeit (näheres siehe unten), zumeist durch eine verbesserte Funktion aus. 2009 waren 21,6% der Nierentransplantationen Lebendspenden.

Aufgrund der herrschenden Organknappheit rückte in den letzten Jahren immer mehr die Möglichkeit der Transplantation von Organen aus sogenannten Non Heart Beating Donors (NHBD) in den Mittelpunkt des Interesses. Die Spender dieser Organe, sind Patienten, die aufgrund einer nichtcerebralen Ursache einen irreversiblen Herzkreislaufstillstand erlitten haben. Dabei spielt insbesondere die Dauer der warmen Ischämiezeit, definiert als Zeit von Beginn des Herzstillstandes bis zur Einleitung einer kardiopulmonalen Reanimation, eine entscheidende Rolle. Zentren, die auf Organe von NHBD zurückgreifen, konnten damit eine deutliche Erhöhung der Spenderorgane erreichen, ohne dass hierdurch wesentlich erhöhte Kosten anfielen (Brook, Waller et al. 2003). In Deutschland werden aufgrund des bestehenden Transplantationsgesetzes die NHBD nicht in den Spenderpool eingeschlossen.

1.1.3 Komplikationen der Nierentransplantation

Bei jeder Transplantation wird die Einpflanzung körperfremden Materials in den Organismus durchgeführt, was eine Erkennung durch das körpereigene Immunsystem zur Folge hat. Um eine Abstoßung zu verhindern ist vor der Transplantation sicherzustellen, dass sich Spender und Empfänger in ihren immunologischen Eigenschaften möglichst wenig unterscheiden. Trotz allem ist der Einsatz immunsuppressiver Medikamente nach der Transplantation unumgänglich. Hierdurch lässt sich die Rate akuter Abstoßungsreaktionen mittlerweile auf circa 10% reduzieren und das 1- Jahres Überleben auf über 90% steigern (Hariharan, Johnson et al. 2000).

Gegenüber der akuten Abstoßungsreaktion stellt das chronische Transplantatversagen (chronic allograft nephropathy CAN) weiterhin ein häufiges Problem dar. Dieses führt nach 5 Jahren in bis zu 23% zum Verlust des Transplantates (Harris, Coupes et al. 2007).

Unterschiedliche Risikofaktoren wurden für die Entwicklung der chronischen Transplantatnephropathie definiert. Dabei scheinen bereits Schäden in der Frühphase der Transplantation einen bedeutenden Einfluss für das Langzeittransplantatüberleben und die Entwicklung einer CAN auszuüben. Diese Schäden bedingen häufig eine fehlerhafte oder fehlende, initiale Funktion des Transplantates, bezeichnet als ***Delayed Graft Function (DGF)***.

1.2 Delayed Graft Function

1.2.1 Definition

Eine häufige Komplikation postoperativ nach erfolgter Nierentransplantation ist die verzögerte Transplantatfunktion oder Delayed Graft Function (DGF). Diese wird in der Literatur unterschiedlich definiert. In den meisten Studien wird unter diesem Begriff die Notwendigkeit einer Dialysebehandlung aufgrund anhaltender An- oder Oligurie in den ersten sieben Tagen post transplantationem verstanden. Der Begriff der DGF ist somit ein klinischer Begriff, der keine Aussage über die Ursache zulässt.

Die DGF kann von der Immediate Graft Function (IGF) abgegrenzt werden, die das Korrelat für ein unmittelbar funktionstüchtiges Organ darstellt.

Einige Autoren unterscheiden zusätzlich den Begriff der Slow Graft Function (SGF), als mildere Form der DGF. Diese ist im Gegensatz zur DGF nicht durch die Einleitung einer Dialyse gekennzeichnet, zeichnet sich aber durch ein persistierend hohes Serumkreatinin ($>3\text{mg/dl}$) innerhalb der ersten 5 Tage nach Transplantation aus. Die Risikofaktoren die zum Auftreten einer SGF führen, sind dabei ähnlich wie die Risikofaktoren für eine DGF (Humar, Ramcharan et al. 2002; Peeters, Terryn et al. 2004). Rodrigo et al. berichten weiterhin in einer Studie über ein ähnliches Outcome bei Patienten mit SGF (Rodrigo, Fernandez-Fresnedo et al. 2005).

In dieser Arbeit wird die klassische Definition der DGF verwendet:

DGF ist die Notwendigkeit einer Dialysebehandlung innerhalb der ersten 7 Tage nach Transplantation (Koning, Ploeg et al. 1997; Halloran and Hunsicker 2001)

Auch diese Definition ist nicht perfekt. Da die Entscheidung zur Dialyse letztlich subjektiven Einschätzungen und Behandlungsregimen obliegt, ist eine Normierung nicht möglich. Weiterhin gehen in diese Definition auch Patienten ein, die aufgrund anderer Ursachen wie einer postoperativen Hyperkaliämie oder eines Volumenüberschusses trotz einer guten Transplantatfunktion dialysiert werden müssen. Dagegen werden Patienten mit ausreichend vorhandener Eigenausscheidung und einer initial schlechten Transplantatfunktion weniger oft dialysiert. Ähnlich verhält es sich mit Patienten, die eine Transplantation noch vor Einleitung einer Nierenersatztherapie erhalten (Yarlagadda, Coca et al. 2008).

Letztlich ist die oben genannte Definition aber die in den Studien am häufigsten verwendete und wurde daher auch für die vorliegende Studie verwendet. Zudem stellt eine Dialysetherapie gegenüber klinischen Parametern wie Serumkreatininwert, Urinausscheidung oder die benötigte Zeit eine Kreatininclearance über 10 ml/min zu erreichen, einen klarer definierten Endpunkt dar.

Die Inzidenz der DGF wird in der Literatur mit 25-40% je nach Kollektiv angegeben (Peeters and Vanholder 2008). Die großen Schwankungen in den Inzidenzen resultieren dabei aus dem verwendeten Spenderpool. Bei Transplantationen von Organen eines NHBD steigt die Rate einer DGF deutlich an (Schlumpf, Weber et al. 1996; Tanabe, Oshima et al. 1998).

Das Auftreten einer DGF nach einer Lebendspende wird in einer Studie mit 6% angegeben, was vergleichsweise hoch ist (Halloran and Hunsicker 2001).

1.2.2 Pathophysiologie der DGF

Biopsien von Nieren mit einer DGF zeigen typischerweise das histologische Bild einer Akuten Tubulusnekrose (Halloran and Hunsicker 2001). Diese äußert sich im Bild durch eine Aufweitung der Tubuli, eine Degeneration des Bürstensaumes bei proximalen Tubuli und ein abgeflachtes Tubulusepithelium (McLaren, Zhang et al. 2004). Weiterhin findet man vermehrte Zellnekrosen und Apoptosezeichen (Solez, Racusen et al. 1993).

1.2.2.1 Ischämie Reperfusionsschaden

Das Konzept des Ischämie Reperfusionsschadens fasst die für die Pathophysiologie der DGF verantwortlich gemachten Abläufe zusammen. Dabei unterteilt man die initiale Schädigung durch die Ischämie sowie die anschließende durch die Reperfusion entstehenden Zell- und Gewebeschädigungen. Dabei sind die beschriebenen Vorgänge nicht pathognomonisch für eine Transplantation mit anschließender DGF, sondern treten allgemein in Rahmen von Perfusionsstörungen auf. So kann ein Ischämie- Reperfusionsschaden (I/R) auch im Rahmen eines Myokardinfarktes oder Apoplex entstehen. Durch die initiale Ischämie kommt es zur Aktivierung einer Kaskade im Bereich der Zellebene.

Aufgrund der Hypoxie in der Phase der Ischämie kommt es zum Erliegen der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien. Dies führt zu einer fehlenden Produktion energiereicher

Phosphate wie ATP (Adenosintriphosphat) und einem Anstieg der anaeroben Glykolyse. Es kommt zu einem Abbau von ATP zu Adenosin und Hypoxanthin. Da diese membrangängig sind, gehen sie der Zelle für die weitere Energiegewinnung verloren. Weiterhin kommt es zum Ausfall der Na/ K- ATPase mit konsekutivem intrazellulären Anstieg von Natrium und Chlorid sowie Kalzium. Folge ist ein Wassereinstrom mit intrazellulärem Ödem (Weinberg 1991). Durch die Zunahme der anaeroben Glykolyse kommt es zudem zu einem intrazellulären Laktatanstieg, mit Erniedrigung des intrazellulären pH Wertes, was zu einer Aktivierung lysosomaler Enzyme führt (Perico, Cattaneo et al. 2004). Im Verlauf kommt es zur Entstehung freier Sauerstoffradikale, welche wiederum in der Lage sind, die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) zu begünstigen (Haugen and Nath 1999). Das gebildete NO wirkt über seinen Metaboliten Peroxynitrit stark zelltoxisch, indem es zu einer Inhibierung der Zellatmung, DNA Synthesehemmung und zur Zerstörung des Zytoskeletts führt (Noiri, Nakao et al. 2001). Obwohl NO aufgrund seines vasodilatierenden Effektes zu einer Verbesserung der lokalen Perfusion und damit zu einer Verringerung des Ischämieschadens führen sollte, hat es somit insgesamt einen negativen Effekt auf das Transplantat. So konnte im Tierversuch eine Hemmung der NO- Synthase eine Verringerung des Ischämieschadens zeigen (Noiri, Peresleni et al. 1996; Ling, Edelstein et al. 1999).

Während der Ischämie wird aber auch die Expression zytoprotektiver Gene und Mechanismen gesteigert, die zu einer Minimierung der Stoffwechselvorgänge in der Zelle führen können. Dabei kommt es zu einer Steigerung der Gentranskription zytoprotektiver und die Zellregeneration unterstützender Gene (Emami, Schwartz et al. 1991). Interessanterweise ist die Konzentration zytoprotektiver Gene wie Heme Oxygenase (HO-1), vascular endothelial growth Factor (VEGF) und Bcl 2 bei Nieren von Leichenspendern niedriger als bei Lebendspendern, was einen defekten Adaptionsmechanismus an den Ischämie Reperfusionsschaden bedeuten könnte (Lemos, Ijzermans et al. 2003).

Durch die Reperfusion nach erfolgter Implantation der Niere wird eine zweite Kaskade zellulärer Mechanismen in Gang gesetzt, welche die Schädigung der transplantierten Niere weiter potenziert. So wird das während der Ischämie angefallene Hypoxanthin zu reaktiven Sauerstoffintermediaten (Superoxidradikale, Wasserstoffperoxid, Hydroxyradikale) abgebaut (Haugen and Nath 1999). Diese wiederum führen zu einer Schädigung der Lipide der Zellmembran, der DNA und Proteinen. Unter normalen Umständen werden die anfallenden Metaboliten durch enzymatische und nichtenzymatische Reaktionen abgebaut (Edelstein, Ling et al. 1997). Im Rahmen des I/ R Schadens kommt es allerdings zu einer deutlichen Überschreitung der Abbaukapazitäten, insbesondere weil die energieabhängigen Systeme nach Ischämie zunächst nicht funktionsfähig sind.

Neben den durch die Hypoxie direkt entstandenen Schäden, trägt das Immunsystem zu einer weiteren Potenzierung der Zellschädigung im Rahmen des I/ R bei (Bonventre and Zuk 2004). Durch die Tubulusepithelzellen und Endothelzellen kommt es zu einer verstärkten Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL- 6 und TNF α . Weiterhin werden Chemokine wie IL-8, MCP-1, RANTES produziert, die die Einwanderung von Neutrophilen Granulozyten und Monozyten begünstigen (Segerer, Nelson et al. 2000; Hoffmann, Kampen et al. 2002; DeVries, Hosiawa et al. 2003). Die Bildung von Eikosanoiden und des Plättchenaktivierenden Faktors führt zur Vasokonstriktion, Plättchenaktivierung und einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität (Okusa 2002). Hierdurch kommt es zu einer Schädigung der Mikrozirkulation mit Verkleinerung der Gefäßdurchmesser, Minderperfusion und konsekutiver verstärkter Hypoxie (Weinberg 1991). Die Vasokonstriktion bedingt eine Zunahme des renalen Widerstandes mit Abnahme der GFR (Perico, Cattaneo et al. 2004).

Das ebenfalls aktivierte Komplementsystem antwortet mit einer Freisetzung der Anaphyltoxine C3a und C5a, welche den Neutrophileneinstrom begünstigen (de Vries, Kohl et al. 2003). Verstärkt wird die Einwanderung inflammatorischer Zellen durch eine vermehrte Expression von Adhäsionsmoleküle (ICAM- 1, Selektine) an den Endothelzellen, die es den aktivierten Zellen erleichtern sich anzusiedeln und in das Gewebe einzuwandern (Bonventre and Colvin 1996). Die eingewanderten Leukozyten können selbst über die Bildung reaktiver Sauerstoff Spezies (ROS) und Eikosanoide zu einer Verstärkung der Zellschädigung, der Inflammation und Veränderung des Gefäßtonus führen, und so die weiteren Schäden potenzieren (Bonventre and Zuk 2004).

Am Ende der komplexen Kaskade steht je nach Schädigungsgrad der Zelltod in Form der Apoptose oder Zellnekrose mit erheblichem Einfluss auf die Transplantatfunktion.

1.2.3 Risikofaktoren für das Auftreten einer Delayed Graft Function

Betrachtet man die Risikofaktoren für das Auftreten einer DGF, so lassen sich spenderassoziierte und empfängerassoziierte Risikofaktoren unterteilen. Abzugrenzen hiervon sind Faktoren, die den Transplantationsablauf betreffen. Diese sind teilweise modifizierbar, stellen also eine Möglichkeit dar, über eine Verbesserung der Abläufe das Risiko für eine DGF zu verringern. Weiterhin müssen auch immunologische Faktoren bei einer Transplantation berücksichtigt werden.

1.2.3.1 Faktoren des Transplantationsablaufes

1.2.3.1.1 Die kalte Ischämiezeit (cold ischaemia time, CIT)

Diese ist definiert als die Zeit zwischen der Explantation des Organs und der Implantation mit Reperfusion der Niere. Sie stellt einen der wichtigsten unabhängigen Risikofaktoren für die Entwicklung einer Delayed Graft Function dar. Dies konnte in mehreren Studien mit unterschiedlichen Kollektiven gezeigt werden (Hetzel, Klein et al. 2002; Quiroga, McShane et al. 2006).

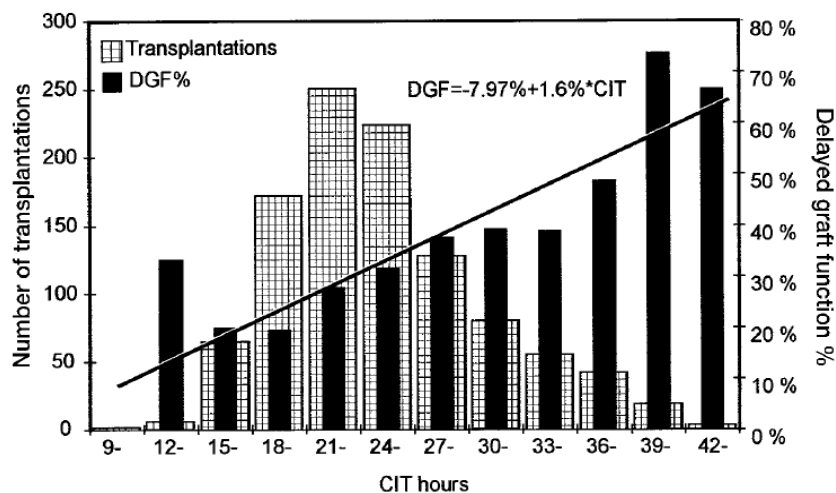


Abbildung 2: Abhängigkeit von der kalten Ischämiezeit (Kyllonen, Salmela et al. 2000)

Die obige Abbildung zeigt, wie sich abhängig von der Kalten Ischämiezeit die Inzidenzen für eine Delayed Graft Function verändern. Dabei wird deutlich, dass sich mit zunehmender CIT eine deutliche Zunahme der DGF- Raten zeigt. In einer weiteren Studie wurde eine 23-prozentige Erhöhung der DGF Wahrscheinlichkeit für eine Verlängerung der CIT um sechs Stunden angegeben (Ojo, Wolfe et al. 1997).

1.2.3.1.2 Reanastomisierungszeit

Ein signifikanter Zusammenhang besteht zwischen dem Auftreten einer DGF und einer verlängerten Reanastomisierungszeit während der Transplantation. Diese ist definiert als die Zeit, zwischen dem Entfernen der zuvor auf Eis gelagerten Niere und dem Öffnen der Anastomose zur Nierenarterie (Pieringer and Biesenbach 2005).

1.2.3.1.3 Organkonservierung

Die Lagerung und Konservierung stellt eine weitere Schnittstelle im Transplantationsablauf dar. Die Konservierungslösung soll den durch die Ischämie ausgelösten Schaden minimieren (Perico, Cattaneo et al. 2004). In einer Studie zeigte sich die Konservierung der Nieren mit der University of Wisconsin (UW- Lösung) Lösung bezüglich des Auftretens einer DGF der Eurocollinslösung überlegen (Ploeg, van Bockel et al. 1992). Die in Europa am häufigsten verwendete Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK), die Histidin als Puffersystem verwendet, zeigte ähnliche Ergebnisse wie die UW- Lösung (de Boer, De Meester et al. 1999). Unklar ist weiterhin inwieweit sich eine kontinuierliche Perfusion gegenüber einer konventionellen kalten Konservierung auswirkt. Zeigte eine Arbeit von 1990 keine wesentliche Verbesserung des Transplantatoutcomes durch eine maschinelle Perfusion (Merion, Oh et al. 1990), fand sich in jüngeren Studien eine Verbesserung der kurz- und langfristigen Transplantatfunktion (Polyak, Arrington et al. 2000). Rahmel et al. verglichen in einer Studie den Effekt einer kontinuierlichen Perfusion auf die Entwicklung einer Delayed Graft Function. Dabei wurde aus 336 Spendern jeweils eine Spenderniere einer kontinuierlichen Perfusion unterzogen, wogegen die andere Spenderniere eine konventionell kalte Konservierung erhielt. Hier zeigte sich ein signifikanter Vorteil zugunsten der maschinellen Perfusion hinsichtlich der Entwicklung einer DGF. Auch der Abfall des Serumkreatinins nach erfolgter Transplantation

und die Rate akuter Abstoßungen war in der Gruppe der Empfänger, deren Transplantat einer kontinuierlichen Perfusion unterzogen wurde, signifikant verbessert (Moers, Smits et al. 2009).

1.2.3.2 Risikofaktoren seitens des Spenders

Aufgrund der Organknappheit wurde in den letzten Jahren versucht den Spenderpool zu vergrößern. Die Definition der Extended criteria donors (ECD) umfasst dabei entweder Spender über 60 Jahre oder zwischen 50 und 59 Jahren mit den zusätzlichen Risikofaktoren arterieller Hypertonus, erhöhtem Serumkreatinin ($>1,5\text{mg/dl}$) oder einem vorangegangenen cerebrovaskulären Trauma. In einer Vergleichsstudie erhöhte sich die CIT- assoziierte DGF deutlich unter den ECD Nieren (Johnston, Thacker et al. 2004).

Insbesondere das Alter des Spenders ist ein wichtiger Risikofaktor für das Auftreten einer DGF. So verdoppelt sich die Wahrscheinlichkeit einer DGF, wenn der Spender über 55 Jahre alt ist (Halloran and Hunsicker 2001). Eine weitere Studie erbrachte einen wesentlichen Unterschied bei Spendern über 60 Jahren für eine DGF (39%vs. 29%) Zusätzlich kommt es zu vermehrten kardiovaskulären Ereignissen bei Empfängern von Nieren älterer Spender (Oppenheimer, Aljama et al. 2004).

Besteht seitens des Spenders ein schlecht eingestellter arterieller Hypertonus, so erhöht sich hier ebenfalls das Risiko für eine Delayed Graft Function nach der Transplantation (Parzanese, Maccarone et al. 2006).

Stirbt ein Spender aufgrund einer Hirnblutung oder eines ischämischen Apoplex, erhöht sich das Risiko für eine DGF deutlich. Zu begründen ist dies mit einer Verschlechterung der renalen Perfusion nach Einsetzen des Hirntodes (Peeters and Vanholder 2008).

1.2.3.3 Risikofaktoren seitens des Empfängers

Seitens des Empfängers scheint sich insbesondere die Art und Dauer der Dialysebehandlung vor der Transplantation auf die Inzidenzen der DGF auszuwirken. So hatten in einer großen amerikanischen Analyse durch Snyder et al. Patienten mit Peritonealdialyse ein geringeres

Risiko für das Auftreten einer DGF (Snyder, Kasiske et al. 2002). Weiterhin spielt auch die Wartezeit auf eine Transplantation eine Rolle. Erklärbar ist dies durch die nach langer terminaler Niereninsuffizienz deutlich vermehrten vaskulären Ereignisse (Pieringer and Biesenbach 2005).

Patienten mit einem Body Mass Index größer 30kg/m^2 zeigten in einer Studie eine deutlich erhöhte DGF Rate gegenüber normalgewichtigen Empfängern (30%vs. 5%) (Espejo, Torres et al. 2003). Plausibel ist auch ein Zusammenhang zwischen niedrigen perioperativen diastolischen Blutdruckwerten und erhöhter DGF Frequenz, aufgrund der potentiellen Verstärkung des Ischämieschadens (Thomas, Mathew et al. 2003). Ebenso erhöht sich das Relative Risiko für Diabetiker (Parekh, Bostrom et al.). Insbesondere Diabetes und Adipositas haben eine Bedeutung, da diese präoperativ bereits optimiert werden könnten.

Eine erhöhte DGF- Inzidenz wird im Rahmen einer Hypercalcämie beobachtet (Boom, Mallat et al. 2004). Hierfür spricht auch das eine perioperative Calciumkanalblockertherapie zu einer Verringerung der Inzidenz akuter Tubulusnekrosen und DGF führt (Shilliday and Sherif 2007).

Die immunsuppressive Therapie ist eine weitere wichtige Variable. Kommt es zu einer DGF, wird die Immunsuppression häufig modifiziert. So führen Calcineurininhibitoren wie Cyclosporin A zu einer verlängerten Erholungszeit gegenüber einer akuten Tubulusnekrose insbesondere nach langer Konservierungszeit, so dass diese nur in reduzierter Form oder verzögert gegeben werden. Ein erhöhtes Auftreten einer DGF wird auch unter der Gabe des mTOR – Inhibitors Sirolimus beschrieben. Dabei erhöht sich die Wahrscheinlichkeit abhängig von der verabreichten Dosis (Smith, Wrenshall et al. 2003). Weiterhin führt Sirolimus zu einer Verlängerung einer DGF Episode (McTaggart, Gottlieb et al. 2003). Eine Erniedrigung der DGF Inzidenz von 28% auf 18% wurde durch Fernandez et al dagegen nach Gabe des Interleukin-2 Antagonisten Basiliximab bei Hochrisikotransplantationen, zusätzlich zu einem Regime aus Steroiden, Tacrolimus und Mycophenolatmofetil beschrieben (Fernandez Rivera, Alonso Hernandez et al. 2005).

1.2.3.4 Genetische Aspekte der DGF

Betrachtet man die oben beschriebenen Risikofaktoren, so lässt sich durch diese zwar eine gewisse Prädiktion bezüglich des Auftretens einer DGF treffen. Trotz allem bleibt bei einzelnen Transplantaten, unabhängig von einer deutlich erhöhten kalten Ischämiezeit, eine DGF aus. Umgekehrt kommt es auch bei Lebendspenden zum Auftreten einer DGF, wobei die Frequenz hier deutlich geringer ist. Aufgrund dieser Betrachtungen ist es wahrscheinlich, dass neben den bekannten Variablen und Risikofaktoren weitere bisher nicht bekannte genetische Veränderungen bestehen, die die Ischämietoleranz des Transplantats und damit das Outcome einer Transplantation beeinflussen. Hierfür spricht weiterhin, dass die Ischämietoleranz von der ethnischen Herkunft des Spenders und des Empfängers abhängig ist. Swanson et al konnten zeigen, dass Nieren afroamerikanischer Spender gegenüber kaukasischer Spender ein signifikant schlechteres Transplantatüberleben zeigen (Swanson, Hypolite et al. 2002). Aufgrund der Überlegung, dass die DGF und der Ischämie/ Reperfusionsschaden in Verbindung stehen und der I/R eine inflammatorische Komponente besitzt, wurde die Rolle proinflammatorischer Zytokine und Chemokine und den in diesen Genen beschriebenen Polymorphismen eingehender untersucht. Untersuchungen im Spendergenom durch Kruger et al. Fanden keine Assoziation des Chemokins RANTES, bezüglich des Auftretens einer DGF (Kruger, Boger et al. 2007). Israni et al. untersuchten Polymorphismen in den Genen für Tumor Nekrose Faktor, TGF β 1, IL-10, p53, and Hemoxygenase1 von Spendern und DGF. Dabei waren weder in den die Inflammation modulierenden, noch die Apoptose beeinflussenden Genen eine eindeutige Assoziation mit statistischer Signifikanz nachweisbar, allerdings zeigte sich das G- Allel des TNF Polymorphismus rs3093662 mit einer DGF assoziiert, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen (Israni, Li et al. 2008).

Neben den möglichen genetischen Einflüssen des Spenders auf die Ischämietoleranz zeigen auch Untersuchungen am Empfänger genom eine mögliche Assoziation. Cosio et al berichten über ein insgesamt schlechteres Outcome bei afroamerikanischen Empfängern gegenüber kaukasischen Empfängern (Cosio, Qiu et al. 1996).

Dass genetische Veränderungen im Rahmen von Transplantationen das Outcome beeinflussen, zeigen Arbeiten, die den Einfluss genetischer Polymorphismen bezüglich des Langzeittransplantatüberlebens untersuchten. So waren Polymorphismen im Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) Gen mit einem schlechteren Transplantatüberleben verbunden (Kruger, Schroppel et al. 2002). Ein weiteres Beispiel sind erhöhte Raten von Transplantatverlusten unter Patienten mit genetisch bedingten Thrombophilien (Fischereder,

Gohring et al. 1998). Durch Hoher et al konnte eine Assoziation zwischen dem Trägerstatus einer Faktor V Leiden Mutation und dem Auftreten einer DGF unter Empfängern gezeigt werden (Hoher, Slowinski et al. 2002).

St Peter et al. untersuchten den Einfluss von Polymorphismen im Gen der Glutathion S Transferase, sowohl unter Spendern als auch Empfängern. Während bestimmte Polymorphismen im Spendergenom eine Verringerung der DGF Rate zeigten, war im Empfänger-genom kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Genotypen feststellbar (St Peter, Imber et al. 2002).

1.2.3.5 Immunologische Faktoren

Immunologische Aspekte spielen im Rahmen der Nierentransplantation eine große Rolle. Ein erhöhtes Risiko für eine DGF zeigt sich bei einem hohen HLA- Mismatch zwischen Spender und Empfänger (Halloran and Hunsicker 2001). In einer Arbeit von Monteiro et al zeigte sich, dass 90% der Patienten mit mehr als 50% panel reactive antibodies (PRA) vor der Transplantation, eine DGF entwickelten (Monteiro, Buelow et al. 1997) . Weiterhin zeigt sich eine Verminderung des Transplantatüberlebens bei erhöhten PRAs über 50% vor Transplantation (Arias 2003). Ein früheres positives HLA Crossmatch zieht ebenfalls eine erhöhte DGF Rate nach sich (Noreen, McKinley et al. 2003).

1.2.4 Auswirkungen der DGF auf die Langzeitfunktion

Der Einfluss des Auftretens einer DGF für das weitere Transplantatüberleben wird kontrovers diskutiert. In einigen Arbeiten wird die Delayed Graft Function als unabhängiger Risikofaktor für ein vermindertes Transplantatüberleben angesehen (Pfaff, Howard et al. 1998). In einer Analyse durch Koning et al. war das Transplantatüberleben nach einer DGF um 10% erniedrigt (Koning, Ploeg et al. 1997). Bei Kindern ist das Auftreten einer DGF mit einem deutlich schlechteren Outcome nach Transplantation verbunden (Tejani, Sullivan et al. 1999). Andere Arbeiten sehen dagegen nur die Kombination einer DGF mit einer akuten Abstoßungsreaktion ursächlich für ein vermindertes Transplantatüberleben (Troppmann, Gillingham et al. 1996; Senel, Karakayali et al. 1998). Zudem besteht nach einem Jahr im Vergleich zu einer IGF eine Erniedrigung der GFR (Lebranchu, Halimi et al. 2005). In einer durch Yarlaga 2008 durchgeführten Metaanalyse, zeigt sich eine Risikoerhöhung um 41% für einen Verlust des Transplantats unter DGF Patienten. Zudem erhöht sich das Risiko für eine akute

Abstoßungsreaktion um 38%. Daneben hatten Patienten nach einer DGF ein erhöhtes Serum Kreatinin im Follow- up (Yarlagadda, Coca et al. 2009).

Der von einer akuten Abstoßungsreaktion unabhängige Einfluss der Delayed Graft Function auf das Langzeitüberleben des Transplantates ist insbesondere deswegen entscheidend, da hierdurch trotz Optimierung der immunsuppressiven Therapie das Langzeitüberleben beeinflusst wird (Irish, McCollum et al. 2003). Deutlich wird dies am Rückgang der akuten Abstoßungsreaktion, bei weiterhin stagnierenden Inzidenzen einer DGF (Gjertson 2000; Halloran and Hunsicker 2001).

Aufgrund zusätzlicher Intensivtherapie, der Notwendigkeit der Dialyse, Biopsien und damit verbundener verlängerter Krankenhausverweildauer stellt die DGF aber nicht nur ein klinisches, sondern auch ein in heutigen Zeiten wichtiger gewordenes gesundheitsökonomisches Problem dar (Almond, Troppmann et al. 1991; Marcen, Orofino et al. 1998). Die durchschnittliche Verlängerung des Krankenhausaufenthaltes gegenüber Patienten mit normaler Transplantatfunktion verlängert sich um circa 10 Tage (Rosenthal, Danovitch et al. 1991). Weiterhin wird durch das Auftreten einer DGF das Risiko mit einem funktionsfähigen Organ zu versterben, erhöht. Dabei zeigten sich unter den DGF Patienten mehr kardiovaskuläre und infektiöse Ereignisse als Todesursache. Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind bisher allerdings nur unzureichend verstanden (Tapiawala, Tinckam et al. 2010).

1.2.5 DGF Prognose Score

Da die DGF wie beschrieben ein großes Problem im Rahmen der Nierentransplantation darstellt, liegt das Interesse in der Prädiktion des Auftretens einer DGF. Durch verschiedene Arbeitsgruppen wurde daher versucht einen Score zu etablieren der anhand von Risikofaktoren die DGF Wahrscheinlichkeit einschätzen kann.

Irish et al. erstellten einen Punktescore, bei dem 16 unterschiedliche Risikofaktoren sowohl von Spendern als auch Empfängern berücksichtigt werden. Daten von fast 14000 Patienten des „United States Renal Data System“ wurden auf Risikofaktoren für die Entstehung einer DGF untersucht. Aufgrund der multiplen zu berücksichtigenden Variablen ist dieser Score in der Klinik aber nur bedingt anzuwenden.

Durch Lendres et al. wurde 2009 ein Score entwickelt, in dem sechs verschiedene Risikofaktoren eingehen. Dieser scheint von der Praktikabilität etwas einfacher zu sein, besitzt dabei aber eine ähnliche Genauigkeit (Jeldres, Cardinal et al. 2009). Beide Scores besitzen nur eine eingeschränkte Vorhersagekraft, so dass nie alle Patienten mit DGF selektiert werden. Trotz allem geben sie eine Hilfestellung bei der Überwachung von Risikopatienten.

1.2.6 Strategien zur Prävention einer DGF

Wie oben beschrieben ist die Therapie der DGF eine überbrückende Dialyse bis zum Einsetzen der Eigenfunktion. Zur Verhinderung einer DGF sind in den letzten Jahren unterschiedliche Ansätze entwickelt worden, die auf die Minimierung der Risikofaktoren abzielen oder auf die pathophysiologischen Abläufe während des Ischämie/Reperfusionsschadens Einfluss nehmen sollen.

Zur Minimierung der Risikofaktoren muss zunächst die Identifizierung von Risikopatienten erfolgen. Wie oben beschrieben gehört dabei insbesondere bereits die präoperative Optimierung von Blutzucker, Blutdruck und Gewicht zu den wichtigen Aufgaben.

Daneben muss versucht werden, zur Vermeidung von Organschäden, die hämodynamischen Verhältnisse bei hirntoten Spendern möglichst konstant zu halten. Hypotension aufgrund von Volumendepletion oder parasympathischer Überaktivität sollten so gering als möglich gehalten werden, um die renale Perfusion nicht zu stören (Peeters and Vanholder 2008).

Um den Transplantatablauf zu verbessern, gilt es vornehmlich die kalte Ischämiezeit so gering als möglich zu halten.

Basierend auf den pathophysiologischen Erkenntnissen wurde in experimentellen Ansätzen versucht, die inflammatorische und vasoreaktive Komponente des I/R zu beeinflussen. Günstige Ergebnisse in Tierversuchen wurden unter anderem nach Gabe von Antikörpern gegen Adhäsionsmoleküle (Dragun, Tullius et al. 1998), Caspase Inhibitoren (Peeters and Vanholder 2008), Endothelinantagonisten (Huang, Huang et al. 2002), N- Acetylcystein (Sehirli, Sener et al. 2003), Inhibitoren von TNF α (Ben-Ari, Hochhauser et al. 2002) und durch Induktion der Heme Oxygenase- 1 beobachtet (Wagner, Cadetg et al. 2003). Allerdings müssen diese Ergebnisse am Menschen überprüft werden. Bis 2015 konnte bei keinem der experimentellen Ansätze tatsächlich im klinischen Umfeld ein positiver Nutzen belegt werden.

Daneben wurde versucht durch Gabe von Wachstumsfaktoren einen Einfluss auf den I/R Schaden zu nehmen. Sowohl Insulin- like Growth Factor (IGF) als auch Hepatozyte Growth Factor (HGF) zeigten bei Ratten eine beschleunigte Erholung nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden (Edelstein, Ling et al. 1997). Die günstigen Ergebnisse konnten in einer Studie am Menschen allerdings nicht reproduziert werden, so dass diese Therapieform keinen wesentlichen Einfluss auf den I/R hat (Hladunewich, Corrigan et al. 2003). Ein weiterer interessanter Wachstumsfaktor ist Erythropoietin (EPO). War dessen Rolle lange nur in der Förderung der Erythropoiese gesehen worden, beschäftigen sich mehrere neuere Arbeiten mit dem Einfluss auf den I/R Schaden und auch der Entwicklung einer DGF (Mohiuddin, El-Asir et al. 2007; Martinez, Kamar et al. 2010).

1.3 Erythropoietin

1.3.1 Allgemeines

Erythropoietin ist ein für die Erythropoese essentielles Hormon. Das humane Gen befindet sich auf Chromosom 7q22, besteht aus fünf Exons und vier Introns und ist mit einer Sequenzhomologie von 80-82% verglichen mit anderen Säugetierspezies hoch konserviert (Wen, Boissel et al. 1993). Das sezernierte Hormon ist ein 30,4 kDa schweres Glykoprotein. Es wird als ein 193 Aminosäuren (AS) langes Polypeptid synthetisiert und nach Abspaltung eines Führungsstranges von 27 AS und eines carboxyterminalen Arginins als 165 AS langes Peptid sezerniert (Law, Cai et al. 1986). Vor der Geburt erfolgt die Herstellung in der fetalen Leber (Congote 1977). Nach der Geburt übernehmen peritubuläre Fibroblasten der Nierenrinde die Hauptproduktion von EPO (Jelkmann 1992). Diese Zellen stehen im direkten Kontakt mit Kapillaren und den angrenzenden Tubuluszellen der Niere. Unter bestimmten Bedingungen, wie einer starken Anämie oder einer chronischen Niereninsuffizienz, kann ein Teil der Produktion von EPO wieder in der Leber von Hepatozyten und den Fibroblasten ähnlichen Ito Zellen übernommen werden (Maxwell, Ferguson et al. 1994). Eine Kompensation der EPO Sekretion der Niere ist aber nur bedingt möglich.

1.3.1.1 Regulation der Sekretion

Erythropoietin wird abhängig von der Sauerstoffgewebespannung der Niere sezerniert. Es wird nicht im Gewebe gespeichert, sondern unter bestimmten Bedingungen ins Blut sezerniert. Sinkt der Sauerstoffgehalt des Gewebes wie zum Beispiel während einer Anämie, oder respiratorischen oder kardialen Erkrankungen, kommt es zu einer vermehrten Produktion und Sekretion von EPO ins Blut (Jelkmann 1992). Hauptzielort für das Hormon stellen erythroide Progenitorzellen des adulten Knochenmarks dar (Jelkmann 2004). Dort entstehen nach EPO unabhängigen Wachstum der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle und Stimulation durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie IL-3, GM-CSF, die sogenannten burst forming Units erythroid (BFU-E), welche als erste den EPO- Rezeptor exprimieren. Diese BFU-E verändern sich unter dem Einfluss von EPO zu den kleineren colony forming units (CFU) (Papyannopoulou T. 2000). Stehen die Zellen nicht unter EPO Einfluss kommt es innerhalb von Stunden zur Apoptose (Koury and Bondurant 1992). Die sich aus den CFU entwickelnden

Erythroblasten dagegen, unterliegen bereits nur noch schwach dem Einfluss von EPO (Papyannopoulou T. 2000).

Die molekularen Mechanismen die zu seiner Expression führen, konnten in den letzten Jahren genauer aufgeklärt werden. In Situationen der Hypoxie kontrolliert der Transkriptionsfaktor HIF (Hypoxie inducible Factor) die Expression von EPO und EPOR (Ikeda 2005). Dabei bindet HIF an eine Sequenz im Bereich der 3' flankierenden Region des EPO Gens, die als Hypoxia responsible Element (HRE) bezeichnet wird (Wang and Semenza 1995).

HIF-1 ist ein basic helix-loop-helix- Transkriptionsfaktor bestehend aus den Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β . HIF-1 β ist die konstitutive 91–94 kDa große Untereinheit (Hoffman, et al., 1991). HIF-1 α dagegen ist eine 120 kDa O₂ labile Untereinheit. Während die α - Einheit unter normoxischen Bedingungen in Zellen nicht gefunden wird, ist die β - Einheit konstitutiv vorhanden. Unter Normoxie kommt es über die Hydroxylierung von Prolinresten an den Stellen 402 und 564, in einer als oxygen dependent degradation domain (ODD) bezeichneten Region des HIF-1 α , zur Bindung des im Zytoplasma konstitutiv vorhandenen von Hippel Lindau-Proteins (Huang, Gu et al. 1998). Dieses ist in einem Komplex mit einer E3 Ubiquitin Ligase verbunden, welche zu einer Polyubiquitierung von HIF-1 α führt, durch welche HIF-1 α im Proteasom zerstört werden kann (Maxwell, Wiesener et al. 1999). Unter hypoxischen Verhältnissen hingegen kommt es zum Einwandern von HIF-1 α in den Zellkern, einer stabilen Komplexbildung mit HIF- 1 β , einer Bindung an den Transkriptionscofaktor p300 und zu einer Steigerung der EPO Expression (Bunn, Gu et al. 1998). Interessanterweise führt EPO selbst zu einer Hochregulierung von HIF-1 α im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus (Imamura, Moriyama et al. 2007).

Die Expression von EPO wird aber nicht nur durch Hypoxie gefördert. So ist eine vermehrte Expression auch durch die erhöhte Bildung von TNF α , IL 1 β und IL 6 beschrieben (Nagai, Nakagawa et al. 2001). Dabei reduziert EPO die Entwicklung eines entzündlichen, zytokininduzierten Gewebeschadens als Gegenspieler inflammatorischer Zytokine wie TNF α (Brines and Cerami 2008).

Daneben stellen auch Stoffwechselstörungen wie Hypoglykämien und eine intrazelluläre Hypercalzämie Stimuli für eine vermehrte EPO Sekretion dar (Chong, Kang et al. 2002).

1.3.1.2 Erythropoietin Rezeptor

Nach der Entschlüsselung des Erythropoietingens 1985 (Lin, Suggs et al. 1985), gelang es 1989 den dazugehörigen Rezeptor (Erythropoietinrezeptor, EPOR) zu identifizieren (D'Andrea, Lodish et al. 1989). Das Gen des EPOR findet sich auf Chromosom 19p13.3- p 13.2 und

besteht aus 8 Exons. Während Exon 1-5 den extrazellulären Anteil des Rezeptors codieren, bilden Exon 6 den transmembranösen Anteil und Exon 7 und 8 die cytoplasmatische Domäne (Winkelmann, Penny et al. 1990; Noguchi, Bae et al. 1991). Das EPOR- Gen ist stark konserviert und zeigt eine 82% Homologie zum Gen der Maus. Transgene Mäuse mit einer EPOR Deletion können durch den humanen EPOR vor dem Tod bewahrt werden (Yu, Lin et al. 2001). Das Rezeptorprotein besteht aus 508 Aminosäuren und hat ein geschätztes Molekulargewicht von 55-56 kDa (Jones, D'Andrea et al. 1990).

Wie die Rezeptoren für GM-CSF, IL-3 und IL-6, gehört der EPOR zur Familie der Zytokinrezeptoren (Cosman, Lyman et al. 1990). Diesen gemeinsam ist eine extrazelluläre Domäne nahe der transmembranösen Region bestehend aus einem AS Motiv Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS), wobei X eine beliebige Aminosäure repräsentiert. Dieses ist für die Ligandenbindung und die Signaltransduktion (Yoshimura, Zimmers et al. 1992). Des weiteren finden sich 4 konservierte Cysteinreste in der extrazellulären Domäne (Bazan 1989).

Die intrazelluläre Domäne teilt sich in zwei funktionelle Regionen. Die membrannah proximale Region wird durch Exon 7 kodiert. Diese beinhaltet die Box 1 und Box 2 Motive, Diese werden für die Initiierung der Signalkaskade benötigt (Jiang, He et al. 1996).

Die distale Region der intrazellulären Domäne wird durch Exon 8 kodiert und beinhaltet für den Signalprozess negativ regulierende Domänen (D'Andrea, Yoshimura et al. 1991).

Signaltransduktion

Der EPOR existiert als Dimer. Das Andocken von Erythropoietin bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors. Zwei als Janus family tyrosine protein kinase 2 (JAK2) bezeichnete Moleküle, nähern sich durch die Bindung von EPO aneinander an und es kommt zu einer Transphosphorylierung der JAKs (Witthuhn, Quelle et al. 1993). Die phosphorylierten JAKs führen wiederum zu einer Phosphorylierung von Tyrosinresten des cytoplasmatischen Teils des EPO Rezeptors. Diese dienen als Anheftungsstelle für weitere intrazelluläre Signalproteine. Die weiteren Möglichkeiten der Signaltransduktion werden weiter unten erläutert.

Neben dem als Dimer existierenden Rezeptor, wird in den letzten Jahren eine weitere Variante des EPO Rezeptors postuliert, dem die unten näher besprochenen Gewebe- schützenden Eigenschaften zugeschrieben werden. Dieses Heteromer besteht aus dem EPOR Monomer und einer als common beta receptor (β cR) bezeichneten Einheit, die über eine Disulfid- Brücke verbunden sind. Der β cR ist der signalvermittelnde Teil des Rezeptor- Komplex von Interleukin (IL-)-3, Granulozyte macrophage- stimulating factor (GM-CSF) und IL-5. Die Bindung des gewebesetzenden Moleküls führt dann zur Phosphorylierung der β cR- Untereinheit mit Aktivierung der nachgeschalteten Sinalwege (siehe unten) (Brines and Cerami 2008).

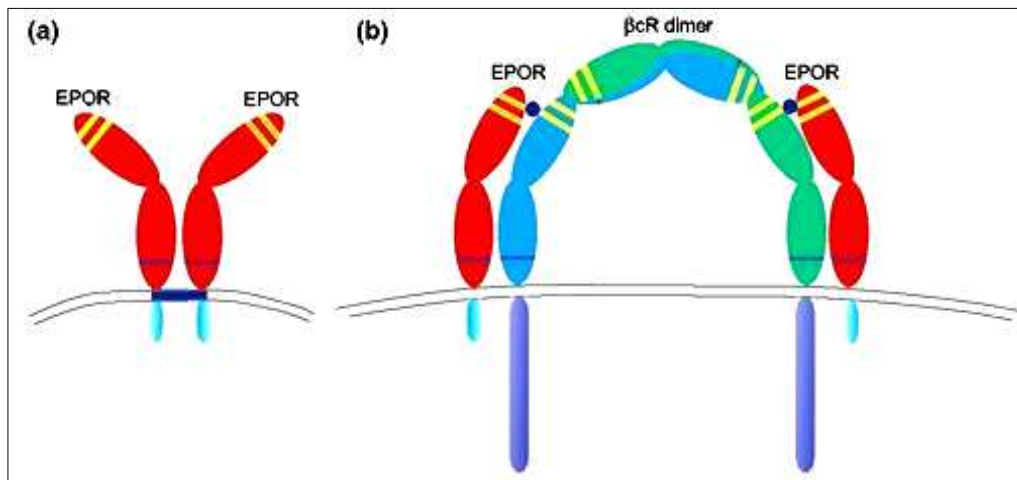


Abbildung 3: Die zwei Formen des Erythropoietin- Rezeptors: auf der linken Seite (a) dargestellt ist das EPOR- Dimer, wie es in hämatopoetischen Zellen angenommen wird; auf der rechten Seite dargestellt ist das vorgeschlagene Modell eines gewebeschützenden EPO- Rezeptors: dabei ist jedes EPOR Monomer mit einer βcR Untereinheit über eine Cystinverbindung verknüpft; Nach Bindung von EPO kommt es in beiden Rezeptoren zur Konformationsänderung mit Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade (Brines and Cerami 2008)

1.3.1.3 Wirkungsweise von EPO

EPO dient wie bereits oben erläutert als Wachstumsfaktor der erythropoetischen Vorläuferzellen. Als Wirkungsweise von EPO wird eine Hemmung der Apoptose, dem programmierten Zelltod angenommen, wodurch es zu einer verstärkten Proliferation und Differenzierung der Erythrozytenvorläuferzellen kommt. Unterschiedliche intrazelluläre Prozesse sind an der protektiven Wirkung beteiligt.

Nach Bindung von EPO kommt es nach oben beschriebenen Phosphorylierungsschritten, zur Phosphorylierung von STAT5, einem Transkriptionsfaktor, der anschließend homodimerisiert und in den Zellkern eindringt (Klingmüller, Bergelson et al. 1996). STAT5 ist an vielen Zellwachstumsprozessen beteiligt. Unter anderem kommt es zur Aktivierung antiapoptotischer Zielgene der Bcl-2 Familie wie Bcl-xL (Nosaka, Kawashima et al. 1999; Zhang, Wang et al. 2007).

Zusätzlich kommt es zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K), die wiederum Proteinkinase B (PKB)/ Akt aktiviert. Akt wiederum ist an der Phosphorylierung von Bad,

einem proapoptotischen Mitglied der Bcl- 2 Familie, beteiligt, so dass es zur Ausschaltung dieses Moleküls kommt.

Des weiteren führen die antiapoptotischen Faktoren PKB zudem zu einer Phosphorylierung des fork head Transkriptionsfaktors FOXO3a- und der Verhinderung der Assoziation mit dem Transkriptionscoaktivator, aufgrund dessen diese nicht in den Zellkern vordringen können, um proapoptotische Gene zu aktivieren (Mahmud, M et al. 2002). Ebenfalls durch AKT wird die Glycogen Synthase Kinase 3 beta (GSK- 3 beta) kontrolliert. Diese führt normalerweise zu einer Erhöhung der proapoptotischen Faktoren c-MYC, c- JUN, beta Catenin und Cytochrom C (Chong and Maiese 2004). Die GSK- 3 beta Aktivität wird aber durch EPO stark supprimiert (Somerville, Linch et al. 2001).

Über die Aktivierung von Akt wird das mitochondriale Membranpotential aufrechterhalten, indem es die Depolarisation und so ein Freiwerden von Cytochrom C verhindert. Cytochrom C aktiviert das Caspase aktivierende Protein APAF- 1, was zur Bildung des Apoptosoms führt. (Reed 2001; Chong, Kang et al. 2003).

Der durch EPO erreichte Zellschutz wird weiterhin über den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelt, der die Transkription der antiapoptotischen Moleküle der Bcl-2-Familie Bfl1 and Bcl-XL, the IAP-family XIAP und c-IAP2 steigert (Reed 2001). NF- κ B steigert wiederum die Freisetzung von EPO (Figueroa, Chan et al. 2002).

Ein weiterer beschriebener Wirkmechanismus von EPO ist die Induktion des Hitze Schock Proteins 70 (Hsp70), welches apoptotische Moleküle hemmt (Yang, Li et al. 2003).

Neben den beschriebenen antiapoptotischen Mechanismen greift EPO auch in inflammatorische Prozesse ein (Olsen 2003). So führt es zu einer Hemmung proinflammatorischer Cytokine wie TNF α und IL- 6, sowie MCP1 (Villa, Bigini et al. 2003).

In der Pathophysiologie der Delayed Graft Function als Folge eines Ischämie/ Reperfusionsschadens spielen viele der oben genannten Cytokine eine wichtige Rolle zur Aufrechterhaltung der entzündlichen Prozesse.

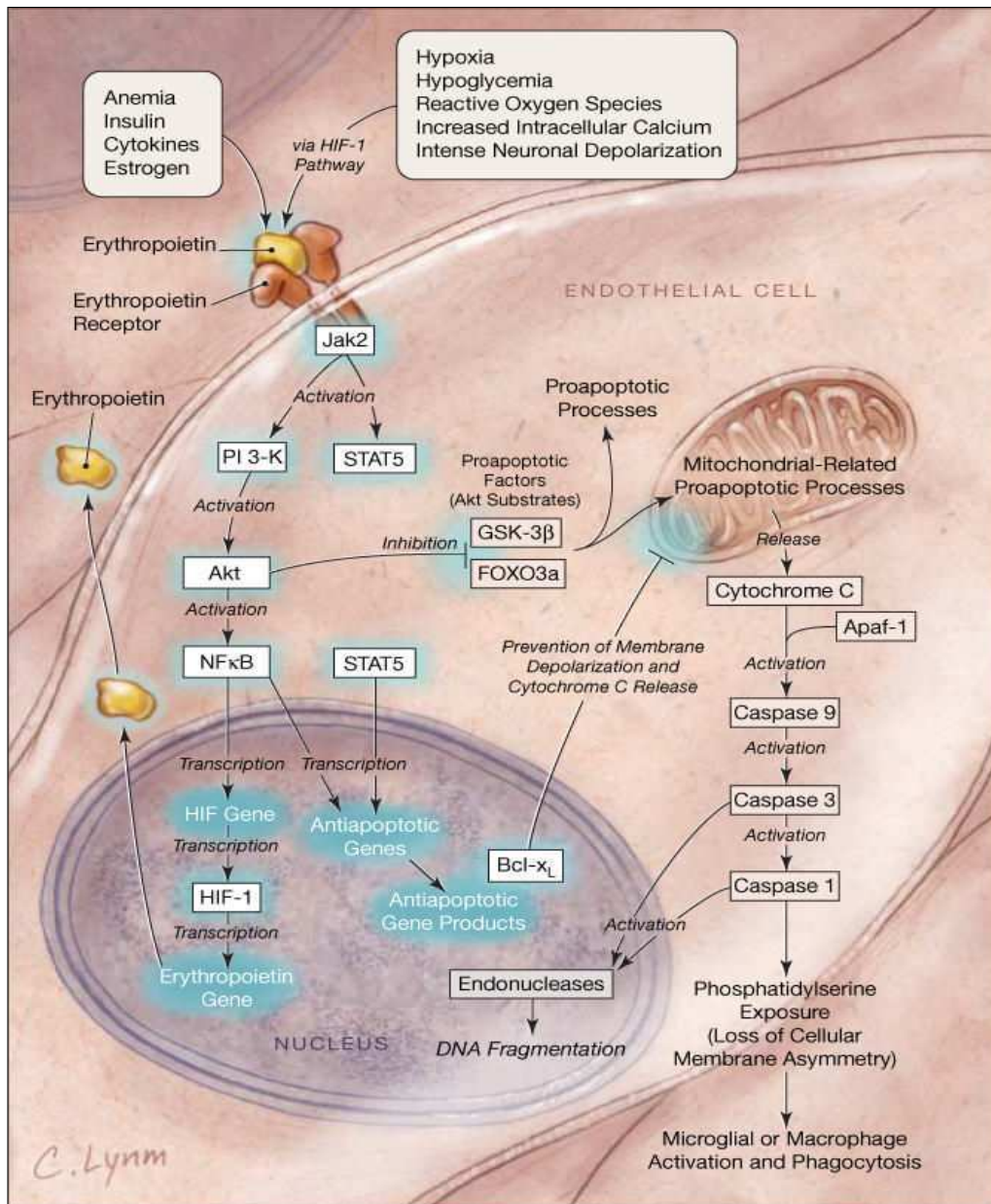


Abbildung 4: Zelluläre Kaskade (nach Maiese, Li et al. 2005)

1.3.2 Effekte von Erythropoietin in nicht hämatopoetischen Geweben

Ging man vor einigen Jahren noch von einer exklusiven Funktion von EPO für die Erythropoiese aus, konnte in den letzten Jahren EPO und sein Rezeptor auch in anderen Geweben nachgewiesen werden.

So konnten Juul et al. den EPO Rezeptor in vielen fetalen Geweben nachweisen, was für eine wichtige Rolle während der fetalen Entwicklung sprechen könnte (Juul, Yachnis et al. 1998).

Dies führte zu weiteren Studien über die Rolle von EPO in unterschiedlichen Organsystemen. Einige sollen hier dargestellt werden.

1.3.2.1 Renale Effekte von EPO

Die Niere ist wie oben dargestellt der Hauptbildungsort von Erythropoietin. Dabei wird EPO in peritubulären Zellen als Ort der größten Hypoxie produziert (Lacombe, Da Silva et al. 1988). Die EPO produzierenden Zellen stehen dabei in direkten Kontakt zu den proximalen und distalen Tubuluszellen. Diese anatomische Nähe könnte direkte endokrine und parakrine Effekte von EPO in der Niere selbst erleichtern. Nieren von Menschen, Ratten und Mäusen exprimieren einen funktionsfähigen EPO Rezeptor. Dieser ist mit dem EPOR auf Vorläuferzellen der Erythrozyten identisch, übernimmt aber mutmaßlich eine Rolle als unabhängiger renaler Wachstumsfaktor (Westenfelder, Biddle et al. 1999). In der Maus wird EPOR sowohl in tubulären als auch in den Podozyten exprimiert (Echigoya, Obikane et al. 2005). Zahlreiche in vivo und in vitro Studien belegen einen Effekt von EPO im Rahmen akuter und chronischer Nierenerkrankungen. So führt EPO in vitro zu einer vermehrten Mitogenität normaler und bösartiger Zellen, zusätzlich fördert es das Überleben geschädigter Tubuluszellen (Westenfelder 2002).

In einer 2004 von Patel et al. durchgeführten Studie, konnte an Mäusen in vivo gezeigt werden, dass nach künstlicher Erzeugung eines Ischämie-Schadens durch beidseitigen Verschluss der Nierenarterien, eine anschließende Gabe von EPO eine signifikante Verbesserung des Outcomes der Nieren erreicht werden konnte. Parameter wie Kreatinin und Harnstoff sanken nach erfolgter Reperfusion schneller ab, als unter Therapie ohne EPO. Des Weiteren war die AST als Marker für den Reperfusionsschaden signifikant niedriger in der EPO Gruppe. Histologisch zeigte sich eine geringere Tubulusdilatation, Schwellung und Nekrose. Weitere Ergebnisse waren eine verminderte Entzündungsaktivität ausgedrückt durch die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) sowie eine geringere Aktivierung des Lipidmetabolismus, gemessen als Aktivität der Gewebemalonalaldehyde (MDA). Über die Hemmung von Caspasen übt EPO, appliziert entweder vor Ischämieinduktion oder kurz vor der Reperfusion, eine antiapoptotische Wirkung im Rattenmodell aus. An humanen, proximalen Tubulusepithelzellen kam zu einer vermehrten Bildung von XIAP und Bclx, zwei antiapoptotischen Faktoren (Sharples, Patel et al. 2004). Neben beschriebenen Faktoren scheint auch NFκB in der Protektion eines Ischämieschadens durch EPO involviert zu sein (Spandou, Tsouchnikas et al. 2006). Durch Yang et al. konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von rekombinantem EPO eine Induktion des Hitze Schock Proteins 70 (HSP 70) erfolgt. Dabei hatte EPO einen protektiven Effekt auf den induzierten Ischämie/ Perfusionsschadens (Yang, Li et al. 2003). Zusätzlich

kommt es unter einer EPO Therapie zu einer Verbesserung chronischer Nierenschädigungen mit verbundener Gefäßsklerose, Glomerulosklerose und tubulointerstitieller Schädigung.

Neben den akut durch Ischämie/ Reperfusion induzierten Schädigungen vermag die Gabe von Erythropoietin auch toxische Nebenwirkungen begrenzen. So konnte der Cyclosporin assoziierte Tubulusschaden in der Rattenniere durch EPO durch Apoptosehemmung verringert werden (Pallet, Bouvier et al.) In Zellkulturuntersuchungen wurde auch der Cisplatin induzierte Nierenschaden durch Epo verringert (Salahudeen, Haider et al. 2008). In Rattennieren konnte dieser protektive Effekt ebenfalls nachvollzogen werden (Vaziri, Zhou et al. 1994).

Species	Cause of renal injury	rHuEPO/darbepoetin- α	Mechanism(s) of protection
Rat ⁸	Chronic renal failure (5/6 nephrectomy)	0.1 μ g/kg darbepoetin- α subcutaneously once weekly	Akt activation ↓Apoptosis ↓Renal vascular degeneration
Rat ⁹	Ischaemic acute renal failure (ischaemia for 30 or 45 min, reperfusion for 48 or 72 h)	500 or 3000 U/kg rHuEPO intravenously on ischaemia, then 24 and 48 h after ischaemia	↑Packed-cell volume
Mouse ¹⁰	Ischaemic acute renal failure (30-min ischaemia, 24-h reperfusion)	1000 U/kg rHuEPO subcutaneously daily for 3 days before ischaemia or 5 min before reperfusion	↓Oxidative stress ↓Lipid peroxidation
Rat ¹¹	Ischaemic acute renal failure (40-min ischaemia, ≤96-h reperfusion)	200 U/kg rHuEPO intravenously 0 and 6 h after ischaemia, then daily administration	↓Down-regulation of aquaporin water-channels and Na ⁺ transporters
Rat ¹²	Ischaemic acute renal failure (30-min ischaemia, ≤48 h reperfusion)	5000 U/kg rHuEPO intraperitoneally 30 min before ischaemia	↓Apoptosis ↑Tubular regeneration
Rat ¹³	Ischaemia-reperfusion (45-min ischaemia, 6-h reperfusion)	300 U/kg rHuEPO intravenously 30 min before ischaemia, 5 min before reperfusion, or 30 min after ischaemia	↓Apoptosis ↓Caspase activation
Rat ¹⁴	Ischaemia-reperfusion (45-min ischaemia, ≤72-h reperfusion)	3000 U/kg rHuEPO intravenously 24 h before ischaemia	↓Apoptosis
Rat ²	Haemorrhagic shock*	300 U/kg rHuEPO intravenously before resuscitation	↓Caspase activation
Rat ²	Endotoxic shock (6 mg/kg bacterial lipopolysaccharide)	300 U/kg rHuEPO intravenously before lipopolysaccharide administration	No protection
Rat ¹⁵	Cisplatin (6 mg/kg a day)	100 U/kg rHuEPO intraperitoneally daily	↑Regeneration of proximal tubule

*Mean arterial pressure reduced to 45 mm Hg for 90 min, then resuscitation with shed blood for 4 h.

Abbildung 5: (Chatterjee 2005)

1.3.2.2 Nervensystem

Dem zentralen und peripheren Nervensystem wurde bezüglich der EPO Forschung in den letzten Jahren große Aufmerksamkeit geschenkt. Sowohl der EPOR als auch EPO werden von unterschiedlichen Zellen (Neuronen, Astrozyten, Mikroglia) im humanen ZNS exprimiert (Juul, Anderson et al. 1998; Nagai, Nakagawa et al. 2001). In Mäusen führt eine Ausschaltung des EPOR zu Ausfällen der Neuronenproliferation am Mausembryo, und einer verminderten Erholung nach der Induktion eines Apoplexes an der adulten Maus (Tsai, Ohab et al. 2006; Chen, Asavaritikrai et al. 2007). Dies macht eine wichtige Rolle des EPO/ EPOR- Systems sowohl bei der neuronalen Entwicklung als auch bei der neuronalen Regeneration sehr wahrscheinlich. Aufgrund dessen wurde eine autokrin/ parakrine Rolle für EPO im ZNS postuliert (Byts and Siren 2009). Hauptreiz für die EPO und EPOR Expression sind auch im ZNS die Hypoxie oder Ischämie (Bernaudin, Marti et al. 1999; Byts and Siren 2009).

Brines et al machten die Beobachtung, dass der durch EPO und CEPO vermittelte neuroprotektive Effekt, durch eine Ausschaltung des common beta receptor (βcR), einer für die Signaltransduktion des IL3, IL 5 und G-CSF Rezeptors benötigten Untereinheit, nicht zu induzieren ist. Daraus wurde gefolgert, dass der EPOR im ZNS aber auch anderen Geweben wie Herz und Rückenmark eine andere Konformation einnimmt, indem es zur Bildung eines Heterodimers mit EPOR und dem common beta receptor kommt (Brines, Grasso et al. 2004). Aufgrund der Beobachtung, dass EPO in hoher Dosierung trotz seines hohen Molekulargewichts die Blut Hirn Schranke passiert, wurden neue experimentelle Studien über die Wirksamkeit von EPO im ZNS konzipiert (Brines, Ghezzi et al. 2000; Banks, Jumbe et al. 2004). Der Hauptmechanismus der Neuroprotektion ist die beschriebene Hemmung der Apoptose. Dabei kommt der Kaskade mit Aktivierung von Akt eine wichtige Rolle zu (Wu, Shang et al. 2007) . Weiterhin wird über die beschriebene Kaskade mit NF κB ein Zellschutz gegenüber NO und anderen Radikalen, sowie NMDA vermittelt (Digicaylioglu and Lipton 2001; Chong, Li et al. 2005). Daneben verhindert EPO eine überschießende Inflammation über eine verminderte Genexpression proinflammatorischer Cytokine (IL-6, IL-1 α , IL-1 β), und Rezeptoren (CXCR4) (Avasarala and Konduru 2005). In Tierversuchen führte eine EPO Therapie zu einer deutlichen Verbesserung hypoxisch- ischämischer zerebraler Schädigungen mit Verbesserung der funktionellen Defizite und der Infarktgröße (Wang, Zhang et al. 2007). Diese Ergebnisse zeigten sich sowohl nach einer intraperitonealen als auch intraventrikulären Gabe (Sakanaka, Wen et al. 1998).

Weiterhin vermochte die Gabe von EPO nach induzierter, intrakranieller Blutung eine Verbesserung der funktionellen Defizite, Verkleinerung des Hirnödems und Entzündung im

Blutungsgebiet (Lee, Chu et al. 2006). Bei induzierter Subarachnoidalblutung kam es auch zu einer Reduzierung des Vasospasmus sowohl bei Kaninchen als auch bei Ratten (Grasso, Buemi et al. 2002; Springborg, Ma et al. 2002).

Durch Gabe von EPO konnte der Eintritt einer experimentellen akuten Enzephalitis verzögert werden, was die antiinflammatorische Wirkung von EPO bestätigt (Agnello, Bigini et al. 2002). Hypoxie nach Apoplex, intracerebraler Blutung oder Schädel Hirn Trauma führen auch beim Menschen zu einer vermehrten EPO Expression (Siren, Knerlich et al. 2001).

Somit scheinen auch positive Effekte am Menschen möglich. In einer Arbeit von Ehrenreich et al. wurde an einer kleinen Zahl von 13 Patienten nach hochdosierter intravenöser Gabe von rekombinanten humanen Erythropoietin, sowohl eine Verbesserung des klinischen Outcomes, bestimmt durch die gängigen Scores NIHSS und Scandinavian Stroke Scale, als auch eine Reduktion der Infarktgröße, gemessen mittels Kernspintomographie, sowie des neuronalen Zelluntergangsmarkers S100, beobachtet (Ehrenreich, Hasselblatt et al. 2002). Ehrenreich et al konnten ebenfalls eine Verbesserung der Kognition bei Patienten mit chronischer Schizophrenie unter einer Therapie mit rh EPO zeigen (Ehrenreich, Hinze-Selch et al. 2007). Eine weitere klinische Studie postuliert eine klinische Verbesserung bei Patienten mit Multipler Sklerose unter einer hochdosierten EPO Therapie (Ehrenreich, Fischer et al. 2007). Dies unterstreicht die Annahme einer antiinflammatorischen Wirkung Erythropoietins.

1.3.2.3 Herz

Der EPOR lässt sich im menschlichen Herz an Zellen im Vorhof und der Kammer nachweisen (Depping, Kawakami et al. 2005). Im Anschluss an eine induzierte Ischämie kommt es zu einer vermehrten Bildung von EPO im Herzen (Mengozi, Latini et al. 2006). Aufgrund dieser Beobachtung wurden mehrere in vivo und in vitro Modelle entworfen, die insbesondere den Einfluss von EPO im Rahmen eines Ischämie/ Reperfusionsschadens, wie er im Rahmen einer Myokardischämie entsteht, untersuchten. Dabei konnte in vitro ein Schutz vor Apoptose an Rattenkardiomyozyten gezeigt werden (Calvillo, Latini et al. 2003). Durch in vivo Versuche an Ratten konnte weiterhin eine Verkleinerung der Infarktgröße um 15-25% nach Induktion einer Myokardischämie durch eine EPO Therapie gezeigt werden. Dabei zeigte sich eine deutlich geringere Apoptoseaktivität (Moon, Krawczyk et al. 2003). Weiterhin war am Rattenmodell eine Verringerung des linksventrikulären diastolischen Drucks sowie eine Reduktion der ANP Konzentration zu beobachten (van der Meer, Lipsic et al. 2005), was einen günstigen Einfluss auf die Kontraktilität ausübt.

Im Mausmodell kam es zu einer Verbesserung der Kontraktilität der Kardiomyozyten (Sterin-Borda, Barcelo et al. 2003). Xu et al. konnten im Mausversuch zeigen, dass die kardioprotektive Wirkung von EPO über eine Aktivierung die oben beschriebenen PI3K/ AKT vermittelt wird. Nach Gabe einer PI3K Inhibitors kam es dagegen zu einer Blockierung der positiven Effekte von dem verwendeten CEPO (carbamyliertes EPO) (Xu, Cao et al. 2009). In dieser und einer anderen durch Fiordaliso durchgeführten Studie wurde statt dem üblichen rekombinanten EPO, CEPO ein Derivat ohne Wirkung auf die Erythropoese verwendet. Die unter dem verwendeten Präparat beobachteten positiven Effekte auf die Kardiomyozyten lassen sich daher nicht durch eine Steigerung der Hemoglobinkonzentration erklären, sondern sind im Rahmen einer Apoptosehemmung zu verstehen (Fiordaliso, Chimenti et al. 2005). Ein postulierter Mechanismus für die Kardioprotektion durch EPO nach erfolgter Ischämie ist eine vermehrte Neovaskularisation. Diese wird über endotheliale Progenitorzellen aus dem Knochenmark und die vermehrte Ausschüttung von VEGF vermittelt (Westenbrink, Lipsic et al. 2007).

1.3.2.4 Leber

An der Ratte konnte durch Schmeding et al. gezeigt werden, dass durch die subkutane oder portalvenöse Gabe von rekombinanten humanen Erythropoietin nach einer 70% Hepatektomie, eine Verbesserung der Regeneration, sowie nach 90% Hepatektomie eine Verlängerung der Überlebenszeit erreicht werden konnte. Des Weiteren war in einer anderen Studie eine Verminderung des Ischämieschadens nachweisbar (Schmeding, Neumann et al. 2007). Ebenfalls an der Ratte war eine Verbesserung des Ischämie Reperfusionsschadens durch EPO Gabe nachweisbar (Sepodes, Maio et al. 2006). Im Maus Modell konnte ebenfalls eine Verringerung des hepatischen Ischämieschadens durch die Gabe von rekombinantem EPO beobachtet werden (Hochhauser, Pappo et al. 2008).

1.3.2.5 Endothel

Humane Endothelzellen exprimieren den EPOR (Anagnostou, Liu et al. 1994). Als Wirkungen in vitro wurden eine verstärkte Proliferationsrate und Migration beschrieben (Anagnostou, Lee et al. 1990). Weiterhin wird eine Verstärkung der Neovaskularisation angenommen (Carlini, Reyes et al. 1995). Über eine vermehrte Endothelin-1 Expression und konsekutiver Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration kommt es zu einer Erhöhung des Gefäßtonus (Vogel,

Kramer et al. 1997). An vaskulären glatten Muskelzellen, die den EPO- Rezeptor exprimieren, kommt es ebenfalls zu einer Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration, was zu einer Zunahme des Blutdruckes führen könnte, einer häufigen Nebenwirkung im Rahmen einer Therapie mit Erythropoietin (Neusser, Tepel et al. 1993). Weiterhin kommt es in vivo zu einer Zunahme von endothelialen Progenitorzellen, einem wichtigen Aspekt bezüglich verbesserter Perfusion bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen (Bahlmann, De Groot et al. 2004).

Neben den beschriebenen Effekten, wurde auch in anderen Geweben über protektive Wirkungen berichtet. So vermag die Gabe von EPO während einer Reanimation an Ratten die Überlebenszeit und den Erfolg einer Reanimation günstig beeinflussen (Incagnoli, Ramond et al. 2009). Weiterhin wird ein hämorrhagischer Schockzustand günstig beeinflusst (Abdelrahman, Sharples et al. 2004).

1.3.2.6 Ischämische Präkonditionierung

Der Begriff der ischämischen Präkonditionierung beschreibt den Versuch durch kurze Phasen induzierter Ischämie und anschließender Reperfusion die Toleranz eines Gewebes gegenüber ernsten Ischämie/ Reperfusionsschäden zu erhöhen (Ambros, Herrero-Fresneda et al. 2007). Insbesondere in der Transplantationsmedizin scheint dieser Ansatz im Hinblick auf durch den I/R Schaden induzierte Folgen interessant. Eine Präkonditionierung mit EPO führt zu einem besseren Schutz gegenüber einem Ischämie Reperfusionsschadens in der Niere (Yang, Li et al. 2003).

1.3.3 Veränderungen im Gen des EPO Rezeptors

Der EPO Effekt wird wie bereits oben beschrieben über den EPOR vermittelt. Nach Bindung kommt es zur Initiierung einer Kaskade mit einer Zunahme der antiapoptotischen Aktivität der Zellen. Genetische Untersuchungen des EPO Rezeptors waren nach der Entschlüsselung Gegenstand von Untersuchungen. In experimentellen Studien führte eine Punktmutation an Stelle 484 mit Austausch von Cytosin zu Thymin in der exoplasmatischen Domäne mit damit verbundenem Aminosäureaustausch von Arginin zu Cystein an Stelle 129 zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors unabhängig von der EPO Bindung. Die Mutation führt dabei zu einem verzögertem intrazellulären Transport und Abbau. Die Halbwertszeit des Rezeptors zeigte sich deutlich verlängert gegenüber dem EPOR Wildtyp (Yoshimura,

Longmore et al. 1990). In vivo zeigte sich bei Mäusen, welche mit einem die Mutation tragenden Virus infiziert wurden, eine Polyzythämie und Splenomegalie (Yoshimura, Longmore et al. 1990). Zwei weitere Mutationen, E132C und E133C in der extrazellulären Region zeigten über die Bildung von über Disulfidbrücken verbunden Homodimere eine konstitutive Aktivität (Watowich, Hilton et al. 1994).

Die Untereinheiten des gebildeten EPOR werden zum Großteil im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten. Dagegen gelangt nur ein geringer Teil der produzierten EPOR nach Bildung an die Zelloberfläche. Verantwortlich wird hierfür eine ineffiziente Faltung des EPOR Moleküls gemacht. Durch die Induktion einer Mutation E234A in mittlerer Position der WSXWS Domäne kommt es dagegen zu einer vermehrten Freisetzung an die Zelloberfläche (Hilton, Watowich et al. 1995). Mehrere weitere Studien befassen sich mit der Funktion der WSXWS Domäne. So führt das Einsetzen eines Glyzins zwischen die WS Motive zu einer fehlerhaften Rezeptorstruktur und -funktion (Yoshimura, Zimmers et al. 1992). Aufgrund der gemachten Beobachtungen im Mausmodell und in der Zellkultur wurde der EPOR auch im Zusammenhang mit hämatologischen Erkrankungen beim Menschen untersucht.

So konnten bei der selten auftretenden primären familiären, kongenitalen Polyzythämie (PFCP) Mutationen auf dem Gen des EPOR gefunden werden. Diese liegen allesamt im Bereich der zytoplasmatischen Region des EPOR im Bereich des Exon 8 und führen entweder zu Missensemutationen, Einbau eines Stopcodons oder zur Verschiebung des Leserasters.

Die bisher beschriebenen Mutationen liegen auf einem Bereich von 125bp und führen über die dargestellten Veränderungen zu einem Verlust von 58 bis 110 Aminosäuren des Rezeptors (Percy 2007). Hierdurch entfällt die negativ regulierende Region mit konsekutiver erhöhter Aktivität des STAT 5/ JAK2 Signalwegs. Bei Betroffenen findet man zumeist einen normalen pO₂ in der arteriellen Blutgasanalyse, ein normaler P50 und eine Hypersensitivität von erythroiden Progenitorzellen gegenüber EPO, die zu erhöhten Hämoglobinspiegeln und zu niedrigen EPO Spiegeln im Blut führt (Sokol, Luhovy et al. 1995). Charakteristisch sind des Weiteren normale Thrombozyten- und Leukozytenzahlen, sowie eine fehlende leukämoide Reaktion im Verlauf (Percy, McMullin et al. 1998). Eindeutige gesundheitliche Veränderungen durch die erhöhten Hämoglobinspiegel waren bei den die Mutationen tragenden Personen nicht nachzuweisen. Unter Familienmitgliedern einer betroffenen finnischen Familie fand sich ein mehrfacher Weltmeister und Olympiasieger im Ausdauersport, was einen potentiellen Vorteil Betroffener im Bereich des Ausdauersports vermuten lässt (Juvonen, Ikkala et al. 1991).

Ein Zusammenhang mit Erkrankungen wie der Polyzythämia vera, anderen myeloproliferativen Erkrankungen und myelodysplastischen Syndromen konnte dagegen nicht erbracht werden. (Hess, Rose et al. 1994; Mittelman, Gardyn et al. 1996).

Mutation	Nucleotid Position	Mutationstyp	AS Abbruch	Referenz
G->T	5881	Stop	110	(Arcasoy, Karayal et al. 2002)
Deletion	5938-5941	Frameshift	58	(Petersen, Hokland et al. 2004)
C->G	5964	Stop	83	(Rives, Pahl et al. 2007)
Insertion T	5967	Frameshift	65	(Kralovics, Indrak et al. 1997)
Tandem Duplikation	5968-5975	Frameshift	79	(Watowich, Xie et al. 1999)
Insertion G	5974	Frameshift	64	(Sokol, Luhovy et al. 1995)
Deletion	5985-5991	Frameshift	59	(Kralovics, Indrak et al. 1997)
C->T	5986	Stop	74	(Furukawa, Narita et al. 1997)
G->A	6002	Stop	70	(de la Chapelle, Traskelin et al. 1993)
G->A	6003	Stop	70	(Rives, Pahl et al. 2007)
A->G	6146	Missense Mutation	Punktmutation	(Sokol, Prchal et al. 1994; Le Couedic, Mitjavila et al. 1996)
C->T	6148	Missense Mutation	Punktmutation	(Sokol, Prchal et al. 1994)

Tabelle 1: Mit der familiären Erythrozytose assoziierte EPOR Mutationen (Percy 2007)

Mutationen, die im extrazellulären Bereich des EPOR liegen, waren zum Zeitpunkt der Durchführung der Arbeit nicht beschrieben worden.

1.3.4 Anwendung von Erythropoietin

1.3.4.1 Klinische Anwendung von Erythropoietin

In der klinischen Anwendung wird Erythropoietin hauptsächlich in der Behandlung chronischer Anämien bei Patienten eingesetzt. So reduziert die Gabe von EPO die Notwendigkeit von Bluttransfusionen bei terminaler Niereninsuffizienz (Collins, Ma et al. 1998). Zudem findet die EPO Gabe teilweise Einsatz in der Behandlung von Anämien im Rahmen chronischer Erkrankungen wie Karzinomen oder Infektionen wie HIV (Henry, Beall et al. 1992) oder Hepatitis C (Younossi, Nader et al. 2008). Neben den günstigen Eigenschaften auf die Anämie und damit verbundener Effekte auf die Leistungsfähigkeit von Patienten, gibt es allerdings auch ernstzunehmende Nebenwirkungen einer Behandlung mit Erythropoietin. Insbesondere ein gehäuftes Auftreten von Schlaganfällen und Thrombosen (Bohlius, Wilson et al. 2006) sei

hier genannt. Des Weiteren wird immer wieder auf eine mögliche Verstärkung des Tumorwachstums bei bestehenden Karzinomen hingewiesen (Khuri 2007) hingewiesen. 30% aller Patienten, die längerfristig mit EPO behandelt werden, entwickeln einen Hypertonus, so dass bei Patienten mit einem ohnehin schon schlecht einstellbaren Hypertonus, eine EPO Therapie kritisch gesehen werden muss (Moore and Bellomo). Eine seltene Nebenwirkung ist die pure red cell Anämie, die über neutralisierende Antikörper gegen EPO, zu einem Absinken der Reticulozyten- und Erythroblastenzahl schließlich zu einer Anämie führt (McKoy, Stonecash et al. 2008).

1.3.4.2 EPO und EPOR im Leistungssport

Die Gabe von rekombinanten EPO führt zu einer Erhöhung der Menge an roten Blutkörperchen und damit einer Verbesserung des Sauerstofftransportes. Erhöhte Hämoglobinwerte bedingen eine erhöhte Leistungsbereitschaft des Körpers (Ekblom 1996).

Die maximale Sauerstoffaufnahme $VO_2 \max$ repräsentiert einen guten Marker für die Ausdauerleistungsfähigkeit im Blut. In Ratten führt eine EPO Behandlung zur Vermehrung freier Fettsäuren und Glykogen im Muskel und einer Verminderung der Laktatkonzentrationen, was für eine verbesserte aerobe Energiegewinnung spricht (Lavoie, Diguët et al. 1998). Nach 3- wöchiger Gabe von EPO konnte an Gesunden eine signifikante Erhöhung um durchschnittlich 7% der $VO_2 \max$ erreicht werden (Birkeland, Stray-Gundersen et al. 2000; Russell, Gore et al. 2002). Die durch die Gabe von EPO erreichte Verbesserung der $VO_2 \max$ macht EPO auch für Ausdauersportler interessant. Unklar seit wann, gehört das Doping mit EPO und Derivaten mittlerweile zum Alltag im Bereich des Ausdauerleistungssports.

Kommt es durch die Gabe von EPO zu einer Verbesserung der Leistungsfähigkeit, so stellt sich die Frage inwieweit eine Veränderung des EPOR mit einer erhöhten Aktivität die Leistungsfähigkeit beeinflusst. Dabei sei noch einmal auf den finnischen Langlaufolympiasieger Eero Mäntyranta hingewiesen, der Träger einer Mutation des EPOR im Sinne einer familiären Polyzythämie war (Longmore 1993).

In einer Fall Kontroll Studie zeigte sich eine erhöhte Allelfrequenz eines Tetranukleotidrepeats im nichttranslatierten Bereich des EPOR unter Leistungsausdauersportlern im Vergleich zu Nichtathleten (Wolfarth B 1997).

1.3.5 Fragestellung

Die Delayed Graft Function ist neben der chronischen Transplantatnephropathie ein häufiges Problem im Rahmen der Nierentransplantation. Die wichtigsten Faktoren die für eine DGF prädisponieren sind das Alter des Spenders und die kalte Ischämiezeit. Wie oben beschrieben wurde versucht, anhand von Punktescores das Auftreten einer DGF zu prognostizieren. Allerdings gelingt die Vorhersage nur in circa 70% der Fälle. Weiterhin gelingt es trotz Optimierung des Vorgehens mit Verkürzung der kalten Ischämiezeit und Verwendung von Lebendspenden nicht, das Auftreten einer DGF zu vermeiden. Pathophysiologisch stellt die DGF das klinische Korrelat für einen abgelaufenen Ischämie/ Reperfusionsschaden dar. So kommt es nach einer längeren Ischämiezeit wesentlich häufiger zu einer DGF. Allerdings finden sich auch nach Transplantationen von Nieren mit kurzer Ischämiezeit Raten mit DGF. Dies macht die Rolle anderer, beispielsweise, genetischer Faktoren seitens des Spenders wahrscheinlich, die die Ischämietoleranz des Transplantats verändern.

Wie oben dargestellt ist Erythropoietin in vivo und in vitro in der Lage einen aufgetretenen Ischämie/ Reperfusionsschaden positiv zu beeinflussen. Aufgrund seiner antiapoptotischen und antiinflammatorischen Eigenschaften hat es einen Einfluss auf die zugrunde liegenden pathophysiologischen Prozesse. Die Wirkung von Erythropoietin wird über den Erythropoietinrezeptor vermittelt. Beschriebene Mutationen im Erythropoietinrezeptor im Bereich der intrazellulären Region führen zu einer verstärkten Aktivierung der Rezeptoraktivität. Hierdurch kommt es zur vermehrten Wirkung von Erythropoietin. Klinisch zeigt sich das Bild einer Erythrozytose mit erhöhten Werten für rote Blutkörperchen, Hämatokrit und Hämoglobinspiegel. Dabei scheinen diese Mutationen keine wesentliche pathologische Bedeutung zu haben. Vielmehr ist eine Verbesserung der Leistungsfähigkeit aufgrund dieser Mutationen möglich. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit das Gen des EPOR als Kandidatengen für genetische Untersuchungen gewählt.

Fragestellungen im Einzelnen:

- 1. Gibt es Mutationen im EPOR, die bei Spendern von Nieren mit aufgetretener Delayed Graft Function vorkommen?**
- 2. Sind gefundene Mutationen mit dem Auftreten oder dem Ausbleiben einer Delayed Graft Function assoziiert?**
- 3. In welcher Prävalenz sind diese auch in anderen Kollektiven vorhanden?**

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Die Untersuchungen erfolgten an DNA- Proben verstorbener Organspender. Vor Durchführung der Studie wurde gemeinsam mit der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO), mit Zustimmung der Deutschen Transplantationsgesellschaft (DTG) ein Ethikantrag gestellt. Dazu wurde seit November 2003 in Kooperation mit der Deutschen Stiftung Organspende Region Bayern (DSO) prospektiv von Bayerischen Organspendern nach Aufklärung und Zustimmung der Angehörigen peripheres EDTA- Blut zentral gesammelt und die DNA extrahiert. Als Patientenidentifizierung wurde ausschließlich die von Eurotransplant vergebene ET-Nummer verwandt, wodurch eine Anonymisierung der Proben sichergestellt ist. Insgesamt wurden in dieser Studie 877 Organspender untersucht. Die demografischen Daten wurden aus den Unterlagen der DSO extrahiert.

Die Daten zum klinischen Verlauf nach Transplantation wurden von den teilnehmenden Studienzentren per Formblatt übermittelt.

Zur Identifizierung möglicher neuer Mutationen im EPOR wurden aus diesem Gesamtkollektiv Patienten mit außergewöhnlich guter bzw. schlechter Ischämietoleranz ausgewählt. In diesen Kollektiven wurde die größte Wahrscheinlichkeit für eine Anreicherung von Mutationsträgern angenommen. Es erfolgte die Unterteilung in zwei Gruppen. In die erste Gruppe wurden Spender ohne eine aufgetretene DGF trotz einer erhöhten kalten Ischämiezeit von größer oder gleich 24 Stunden aufgenommen.

Die zweite Gruppe setzte sich aus Spendern mit einer kalten Ischämiezeit kleiner 12 Stunden zusammen, bei denen es zum Auftreten einer Delayed Graft Function gekommen war.

2.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.2.1 Polymerase Ketten Reaktion (PCR; polymerase chain reaction)

Diese von Kary Banks Mullis 1983 entwickelte Methode macht es möglich spezifische Abschnitte der genomischen DNA zu kopieren und anschließend exponentiell zu vervielfältigen.

2.2.1.1 Prinzip

Die PCR verläuft in drei sich wiederholenden Teilschritten.

Denaturierung

Um einen bestimmten Abschnitt der DNA zu vervielfältigen, muss die doppelsträngige DNA zuerst in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt werden. Dies geschieht bei der sogenannten Denaturierung, bei der der Reaktionsansatz auf 95 °C erhitzt wird. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen der dsDNA gelöst und es bilden sich zwei Einzelstränge, die nun zur weiteren Vervielfältigung bereit stehen.

Annealing

Der zweite Schritt, das sogenannte Annealing besteht aus einem Abkühlen der Reaktionstemperatur auf 55-65 °C. Bei dieser binden spezifische, als Primer oder Oligonukleotide bezeichnete Moleküle, an das 5'- und 3'- Ende der beiden Einzelstränge. Diese sind in ihrer Sequenz den beiden Einzelsträngen komplementär. Die optimale Konstruktion der Primer und ihrer Reaktionstemperatur ist ein entscheidender Bestandteil für das Gelingen der PCR. Zu kurze Primer hybridisieren eventuell mit mehreren Abschnitten des Genoms. Dagegen führen zu lange Primer zu einer Verlängerung der Anlagerungszeit, so dass die Effektivität der PCR vermindert wird. In der Kürze eines Reaktionszyklus kann eine vollständige Hybridisierung nicht gewährleistet werden.

Die zweite wichtige Komponente besteht in der Wahl der Anlagerungstemperatur. Diese kann die Spezifität der Reaktion verändern. Wird die Temperatur zu niedrig gewählt, kommt es zu Fehlpaarungen zwischen Primer und Matrizenstrang und es entstehen unspezifische Produkte. Zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur errechnet man die Schmelztemperatur T_m des Moleküls aus Primer und Matrize. Bei dieser kommt es zur Dissoziation des gepaarten Hybrids. Bei einer Temperatur ein bis zwei Grad unter der T_m kommt es normalerweise zu einer vollständigen Anlagerung. T_m wird entweder experimentell bestimmt oder errechnet

$$T_m = (4 \times [G+C]) + (2 \times [A+T]) \text{ } ^\circ\text{C}$$

Die beiden Primer sollten dabei etwa die gleiche T_m haben, um zu hohe oder niedrige Temperaturen für einen der beiden Primer zu vermeiden.

Elongation

Nach der Anlagerung der Primer lagert sich nun eine DNA Polymerase an die kurzen neu entstandenen doppelsträngigen Abschnitte an. Diese Taq- Polymerase wird aus dem hitzeliebenden Mikroorganismus *Thermophilus aquaticus* isoliert und ist auch unter hohen Temperaturen stabil. Es gibt unterschiedliche Arten von Taq Polymerasen. Diese unterscheiden sich in ihrer Eigenschaft entweder bereits bei Raumtemperatur zu reagieren oder erst bei einer Reaktionstemperatur von 95 °C zu reagieren (Hotstart-Taq). Zweitere arbeiten spezifischer, sind aber auch wesentlich teurer.

In Anwesenheit dem Reaktionsgemisch zugesetzter Desoxyribonukleotid Triphosphate (dNTPs) wird der neue Strang durch die Taq- Polymerase komplementär zum Matrizenstrang synthetisiert. Die Geschwindigkeit der Taq- Polymerase beträgt circa 1000-2000 Nukleotide pro Minute. Die optimale Elongationstemperatur liegt dabei zwischen 72-74 °C.

Der oben beschriebene Ablauf aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird während einer PCR je nach eingestellter Zyklusanzahl wiederholt. Dadurch kommt es zu einer theoretisch exponentiellen Vervielfältigung des gesuchten DNA Abschnitts. Man müsste also nach n- Zyklen 2^n doppelsträngige Moleküle erhalten. Die Reaktion geht allerdings nach einiger Zeit in eine Plateauphase über, was zu einer Verringerung der tatsächlichen Ausbeute führt.

2.2.1.2 Standard PCR Protokoll

Zur Optimierung jeder PCR Reaktion müssen die Reaktionsbedingungen für die unterschiedlichen Primerkombinationen gefunden werden. Dabei müssen sowohl die Zahl der Zyklen, die optimalen Anlagerungstemperaturen als auch die Reaktionsmischung angepasst werden. Die PCR Ansätze wurden in 0,5 ml Eppendorf- Reaktionsgefäße pipettiert

Standard PCR Ansatz

10 µl Reaktionspuffer (1,5 mM MgCl₂)

5 µl dNTP Mix (Endkonzentration aller vier Desoxynukleotide 0,125 mM)

1 µl Vorwärts-Primer (400 nM)

1 µl Rückwärts Primer (400nM)

100-200ng genomische DNA

0,25 µl Einheiten Taq Polymerase (1.25 U)

Aqua bidest ad 50 µl

Die dNTP bestehen zu gleichen Anteilen aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP

Die PCR Reaktion wurde in einem Thermocycler mit Deckelheizung durchgeführt.

Es wurde eine initiale Denaturierungszeit von drei Minuten bei 95 °C gewählt. Während der folgenden Zyklen wurde 20 Sekunden denaturiert. Die Annealingzeit und die Elongationszeit betrugen ebenfalls jeweils 20 Sekunden. Nach 40 Zyklen wurde ein letzter Extensionsschritt von 5 Minuten gewählt, um für eine komplette Synthese der PCR Produkte zu sorgen. Die Ramp Time, d.h. die Zeit in der der Thermocycler die Temperatur reguliert betrug 1 °C / sec

2.2.1.3 PCR Bedingungen

	Dauer	Temperatur	Funktion	Zyklen
I	3 Min	95° C	Initiale Denaturierung	1
II	20 sec	95° C	Denaturierung	40
	20 sec	72° C	Annealing	
	20 sec	62° C	Elongation	
III	5 Min	72° C	Abschließende Extension	1

Tabelle 2: PCR Bedingungen

2.2.1.4 Oligonukleotid Primer

Diese sind 20-30 Basen lange, einzelsträngige Moleküle. Sie werden chemisch synthetisiert und lagern sich an die 5 und 3 Enden der komplementären Einzelstränge an und dienen der DNA- Polymerase als Startpunkt bei der Elongation. Sie ermöglichen eine schnelle und spezifische Amplifikation des gesuchten DNA Abschnittes. Des Weiteren können die Primer auch bei der Sequenzierung verwendet werden (siehe unten). Für die Konstruktion der Primer müssen einige Aspekte beachtet werden. So sollten die Basenverhältnisse A/T zu G/C möglichst gleich sein. Repetitive Elemente sollten vermieden werden. Die Vorwärts und Rückwärtsprimer sollten eine ähnlich Schmelztemperatur T_m besitzen. Größere DNA Abschnitte benötigen häufig längere Primer.

Die Primer wurden im Auftrag von der Firma Thermo Electron in Ulm synthetisiert. Die lyophilisierten Primer wurden mit 1xTE Puffer gelöst, um eine Konzentration von 200pmol/μl zu erhalten. Für die PCR wurden die Primer mit Aqua bidest auf 20μM verdünnt.

Verwendete Primer

Name	Orientierung	Sequenz	Fragmentlänge
EP 1-1	5->3	AAG CCA GAA CGG GAG CTG TTG	474bp
EP 1-2	5->3	AGG ACC TAG GCT GGG AGT TCA G	
EP 2-1	5->3	GGC TTT TTT CTT ATC GGG TCC G	341bp
EP 2-2	5->3	CTC AAA CAG CAG GGG ACA TAC G	
EP 2-3	5->3	TGT CTC CCG AGG ATA GAG CTC AG	
EP 2-4	5->3	CAT ACG ACC CTA CGA CCT CCA	
EP 3-1	5->3	CTT GTG TCA CAC ATA CAC ACT GCC	628bp
EP 4-2	5->3	GTA ATG GGA TGT GGG ATG TTA CG	
EP 5-1	5->3	CAT TGC AAT TCT AGG GCA CCG	535bp
EP 6-2	5->3	TGC GTG TCT CTC TCT GAC CCT AG	
EP 7-1	5->3	TGT GCC TCT ATG ACT GGG AGT G	943bp
EP 8-2	5->3	TCT TGA GTC TGC ACT CGT TCT CTG	

Tabelle 3: Verwendete Primer

Für die Amplifizierung von Exon 2 wurde sowohl die Primerkombination EP 2-1 mit 2-2, als auch EP 2-1 mit EP 2-4 benutzt.

2.2.1.5 Agarose Gelelektrophorese

Um DNA- Fragmente aufzutrennen und optisch darzustellen, bedient man sich der Methode des Gel- Elektrophorese. In einem angelegten elektrischen Feld wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung von der Anode zur Kathode. Abhängig von der Länge des Fragments, der angelegten Spannung, der Pufferzusammensetzung, der Konzentration und Dicke des Gels, wandert das PCR Produkt mit unterschiedlich hoher Geschwindigkeit durch die Poren des Agarosegels.

Durchführung

Die Agarose wurde in Marathonpuffer (135 mM Tris, 45 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA) durch Erhitzen in einer Mikrowelle, geschmolzen und anschließend in einen Gelträger gegossen. Je nach der erwarteten Größe der aufzutragenden Fragmente wurden unterschiedliche Agarosekonzentrationen gewählt (normale PCR Produkte 1%; Restriktionsverdaus 2 %).

Die DNA Proben werden zusammen mit einem Ficollladedepuffer, in vorgefertigte Taschen pipettiert. Der Ficollpuffer (15% Ficoll, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol) verhindert zum einen das Aufschwimmen der Proben beim Laden, zum anderen dienen Bromphenolblau und Xylencyanol als Farbstoffmarker, die anzeigen an welcher Stelle sich die Proben im Gel befinden. Parallel zu den Proben wird ein Größenmarker aufgetragen, der aus unterschiedlichen großen Fragmenten bekannter Länge besteht. Anhand dieses Markers ist es zum einen möglich die Größe der Fragmente abzuschätzen, zum anderen dienen die sichtbaren Banden der Bestimmung der Menge von PCR Produkt, die geladen wurde.

Die Elektrophorese wurde abhängig von der Gelgröße mit einer Stromstärke von 40-100 mA durchgeführt.

Nach erfolgter Auftrennung der Fragmente, wird das Gel für ein paar Minuten in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt. Überschüssige Farbe wird durch die anschließende für einige Minuten, fortgesetzte Elektrophorese entfernt. Danach wird das Gel auf einen UV Transilluminator ($\lambda = 302\text{nm}$) gelegt und eine Photographie des gefärbten Gels zur Dokumentation angefertigt.

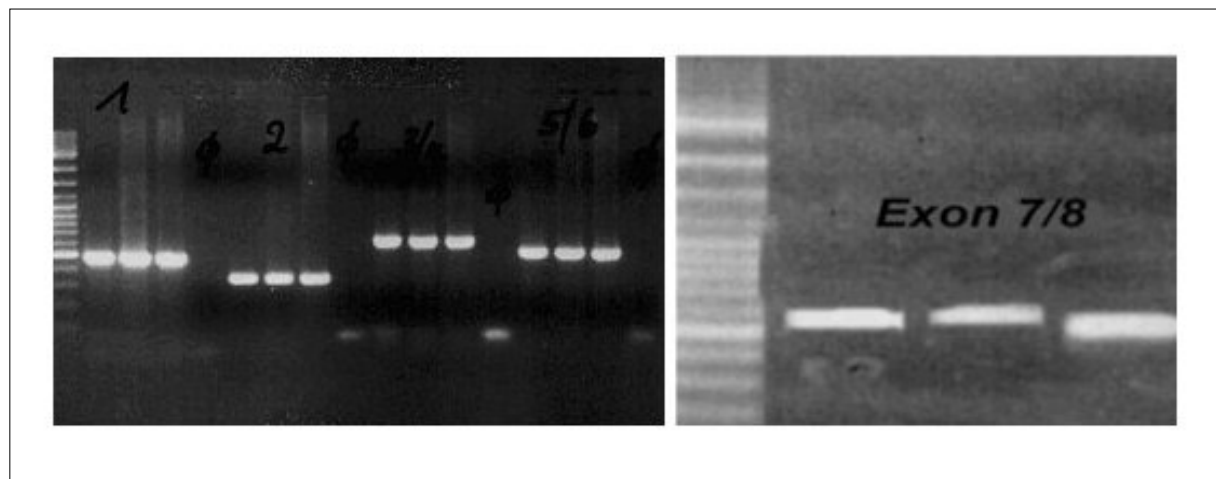


Abbildung 6 PCR Produkte der Exons

Ist bei der PCR das gewünschte Fragment entstanden, steht dieses nun in mehreren Millionen Kopien für weitere Experimente wie Sequenzierung oder Restriktionsverdaus zur Verfügung.

2.2.2 Isolierung von PCR Produkten

Um Methoden wie zum Beispiel eine Sequenzierung anwenden zu können, müssen die PCR Produkte von überschüssigen, nicht benötigten Reagenzien gereinigt werden. Dabei werden Primer, überschüssige Nukleotide (dNTPs), Salze (aus Puffer) sowie die Taq Polymerase aus dem Ansatz entfernt. Hierfür werden Extraktionsmethoden benötigt, die es gestatten, die DNA Fragmente ohne größere Verluste zu isolieren. Das verwendete Prinzip basiert auf der Eigenschaft der DNA, in Anwesenheit eines chaotropen Salzes an Glas oder Silikaoberflächen binden zu können. Nach wiederholten Waschschritten wird die DNA dann frei von oben beschriebenen Verunreinigungen mit Aqua bidest oder einem Niedrigsalzpuffer eluiert.

Durchführung

Für die Aufreinigung des PCR Produkts wurde das QIAquick *Purification Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet.

2.2.3 DNA Sequenzierung

2.2.3.1 Prinzip

Die DNA Sequenzierung wurde von Sanger et al. 1977 entwickelt. Sie funktioniert ähnlich einer PCR. Von einem Oligonukleotidprimer ausgehend, wird durch eine Polymerase der komplementäre Strang einer Einzelstrang DNA synthetisiert. Im Gemisch aus den Nukleotiden, befinden sich außerdem in einem geringeren Verhältnis Didesoxynukleotide (circa 1:100), die bei ihrem Einbau in den Strang zu einem Kettenabbruch führen, da ihnen die für die Kettenverlängerung benötigte 3- OH Gruppe fehlt.

Die Didesoxynukleotide werden zufällig in die Ketten eingebaut, wodurch eine große Zahl von DNA Strängen mit unterschiedlicher Länge entsteht, die sich aber in ihrer Länge um genau eine Base unterscheiden, wodurch sie voneinander getrennt werden können.

Dabei ist jedes Stopnukleotid an einen anderen Fluoreszenzfarbstoff gebunden, welche unterschiedliche Emissionsmaxima besitzen. Dadurch ist es möglich die unterschiedlichen Nukleotide zu detektieren. Praktisch wird das Sequenzprodukt in ein Röhrchen eines Kapillar-Elektrophoresesystems aufgetragen und an einem Fluoreszenzdetektor vorbei geführt.

Die Fluoreszenzsignale werden identifiziert und an einen Computer, der die einzelnen Basen zu einer Sequenz zusammensetzt, übermittelt.

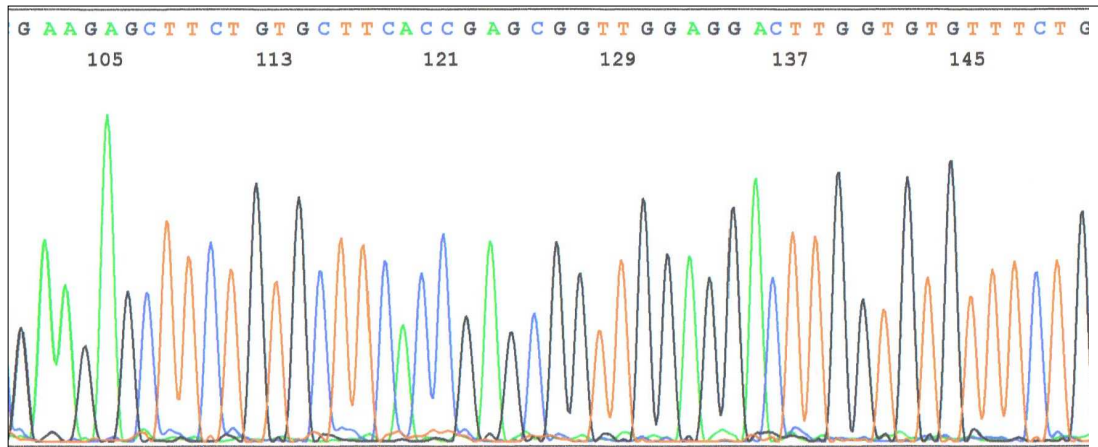


Abbildung 7: Beispiel einer DNA- Sequenz

2.2.3.2 DNA Sequenzreaktion

Sie bedient sich der Methode der sogenannten zyklischen Sequenzierung. Ähnlich der PCR wird dabei ein Zyklus von unterschiedlichen Reaktionstemperaturen durchlaufen, die einer Aufspaltung der Doppelstränge dienen, der Primeranlagerung und der Kettenverlängerung dienen. Dafür wird wiederum eine thermostabile Taq Polymerase benötigt. Diese hat im Gegensatz zur Wildtyp Taq eine höhere Affinität zu Didesoxynukleotiden, wodurch deren Einbau erhöht wird. Ein weiterer Unterschied besteht in der Primerzusammensetzung. Im Gegensatz zur PCR wird nur ein Primer verwendet, um nur die benötigten Einzelstränge zu erhalten.

Reaktionsansatz

3 µl DNA
 1,5 µl Big Dye Reagenz
 1,5 µl Big Dye Puffer
 1 µl Primer
 Aqua bidest ad 10 µl

Primer

Die verwendeten Primer wurden auf eine Konzentration von 5 μM eingestellt und entsprachen den bei der PCR verwendeten Primern.

Sequenzreaktion

	Dauer	Temperatur	Funktion	Zyklen
I	1 Min	96° C	Initiale Denaturierung	1
II	10 sec	96° C	Denaturierung	25
	5 sec	50° C	Annealing	
	4 Min	60° C	Elongation	
III			Abkühlung	

Tabelle 4: Ablauf der Sequenzreaktion

2.2.3.3 Reinigung der Sequenzreaktionsprodukte

Vor dem Auftragen in es notwendig die Sequenzreaktionsprodukte von überschüssigen Reagenzien zu reinigen, um nicht benötigte Produkte wie Primer, Nukleotide und eventuell entstandene artifizielle Produkte zu entfernen. Zunächst wird das Ausgangsvolumen mit 10 μl 125 μM EDTA auf 20 μl aufgefüllt. Dieser Ansatz wird zu 2 μl 3M Natriumacetat Lösung und 55 μl absolutem Ethanol gegeben. Anschließend wird der Ansatz für eine halbe Stunde bei 14.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert, mit 250 μl 70% Ethanol gewaschen, und anschliessend erneut zentrifugiert. Der Waschschrift wird einmal wiederholt. Abschliessend wird das aufgereinigte Sequenzierungsprodukt mit 30 μl einer Formamidlösung gelöst. 15 μl der entstandenen Lösung werden in ein Well einer 96-Well Platte pipettiert und dann im Sequenzer analysiert.

2.2.4 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Mit Hilfe von sogenannten Restriktionsnukleasen ist es möglich, bekannte Mutationen oder Polymorphismen nachzuweisen beziehungsweise auszuschließen. Diese Nukleasen erkennen bestimmte spezifische Sequenzen der DNA und schneiden diese an bestimmten Stellen. Durch Mutationen oder Polymorphismen entstehen entweder neue Schnittstellen, die vom Enzym erkannt werden, oder es fallen Schnittstellen weg. Die Enzyme hydrolysieren die Phosphodiesterbindung des Zucker Phosphat Rückgrats der DNA, wodurch ein 5- Phosphat und 3- OH Ende entsteht. Der Vorteil von Versuchen mit Restriktionsnukleasen liegt in der Möglichkeit eine vorher detektierte Mutation an größeren Kollektiven nachzuweisen, ohne erneut eine Sequenzierung des kompletten Gens durchführen zu müssen. Somit war es möglich das gesamte Kollektiv mit Hilfe des Restriktionsverdau zu untersuchen.

Der Synthesort für die Restriktionsenzyme sind Bakterienstämme. Diese bedienen sich der Enzyme, um sich gegen eindringende Fremd DNA, beispielsweise aus Bakteriophagen zu schützen. Diese Fremd DNA wird an bestimmten Erkennungssequenzen von den Restriktionsenzymen gespalten und anschließend abgebaut. Bakterielle DNA wird durch die Restriktionsnukleasen aufgrund einer Methylierung der DNA nicht geschnitten.

Die Reaktionsbedingungen für die einzelnen Restriktionsenzyme werden vom Hersteller vorgegeben. Nach erfolgtem Restriktionsverdau, werden die Proben auf ein Agarosegel entsprechender Konzentration aufgetragen, in unserem Fall wurde ein 2% Agarose Gel verwendet.

Genort	Restriktionsendonuklease	Erkennungssequenz	Reaktionsbedingungen
Exon 2	Apa I	5...GGGCC↓C...3 3...C↑CCGGG...5	NEB Puffer 4 Verdau bei 25 C
Exon 3/4	Not I	5...GC↓GGCCGC...3 3...CGCCGG↑CG...5	NEB Puffer 3 Verdau bei 37 C

Tabelle 5: Verwendete Restriktionsenzyme

Standardreaktionsansatz

11,5 µl PCR Produkt
1,5 µl Puffer
1,5 µl BSA
0,5 µl Restriktionsenzym
15 µl Endvolumen
->Verdau über Nacht

2.2.5 Ethanolpräzipitation der DNA

In einigen Fällen ist es nötig das erhaltene PCR Produkt durch eine Ethanolfällung aufzukonzentrieren. Prinzip hierbei ist die Eigenschaft von Nukleinsäuren in Gegenwart von Salzen durch Alkohole auszufällen. Die im wässrigen Milieu negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA binden positiv geladene Salzkationen. Gibt man anschließend absoluten Alkohol zu dem Salz DNA Gemisch, kommt es zum Wasserentzug und zur Präzipitation der DNA.

Durchführung:

Der wässrigen DNA Lösung wird 4 M NaCl zugefügt und eine Endkonzentration von 200mM eingestellt. Anschließend wird das 2,5 fache Volumen 100% Ethanols zugegeben. Diese Lösung wird nun entweder 5 Minuten in flüssigem Stickstoff, 30 Minuten bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, oder über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt, wodurch die Nukleinsäuren ausgefällt werden. Nach folgender Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit 14000UpM wird der Überstand abgekippt und das übriggebliebene DNA Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wird die DNA je nach Ausgangsvolumen entweder mit Aqua bidest oder auch mit einem Restriktionsgemisch resuspendiert.

Schema für Resuspendierung des PCR Produkts mit Restriktionsgemisch

7,5 µl H₂O
1 µl NEB Puffer
1 µl BSA
0,5 µl Restriktionsenzym
10 µl Gesamtvolumen
-> anschließender Verdau über Nacht

2.2.6 Verwendete Geräte und Substanzen

Kategorie	Typ	Hersteller
Elektrophoresekammern	Horizon 58 und Horizon 11-14	Gibco BRL life Technologies, Eggenstein
Heizblock	Multi Block Heater, Lab Line	Lab Line Instruments Inc. USA
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Sequencer	3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Thermocycler	MJ Research PTC-225	Biozym
	GeneAmp PCR System 9600	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Tischzentrifugen	Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
	TDTMX Centrifuge	Abbott Diagnostics, Division, Illinois, USA

Tabelle 6: Verwendete Geräte

Reagenzien

PCR

Go Taq Polymerase + Puffer (Promega)

DNTPs (GE Healthcare)

Primer (Thermo Electron, Ulm)

Sequenzierung

Big Dye Puffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Big Dye Reagenz mit Ampli Taq DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

2.3 Statistik und Software

2.3.1 Statistik

Um zu überprüfen, ob sich die untersuchte Population einer idealen Population (d.h. es ist unter anderem Panmixie, keine Selektion, Mutation und Migration gegeben) annähert, wird das Hardy Weinberg Gesetz angewendet. Hiermit wird getestet, ob eine Übereinstimmung zwischen den aus den Allelfrequenzen erwarteten und den tatsächlich beobachteten Genotypenfrequenzen besteht, d.h. ob die beobachteten Ergebnisse im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht liegen.

Hardy-Weinberg-Gesetz: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

2.3.2 Software

Die Alignments und die Abstandmatrix wurde mit dem Programm STRAP (Structure based Sequences Alignment Program, Autor: Christoph Gille, Institut für Biochemie, Charité, Humboldt-Universität zu Berlin, Group for Computational Biochemistry, Group Leader: Prof. H. Holzhütter) erstellt. Die Sequenzen entstammen den Datenbanken des European Bioinformatics Institute (EBI, Homepage: <http://www.ebi.ac.uk/>) und des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Homepage: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/proteins/>). Die dreidimensionalen Abbildungen mit Darstellung der Aminosäuren wurden mit dem Programm Cn3D 4.1 des NCBI (Homepage: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>) erstellt.

Die statistische Auswertung wurde mit den Programmen SPSS (Version 15.0 für Microsoft Windows XP) und Microsoft Excel 2003 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Daten

Insgesamt wurden 877 Spender aus verschiedenen Zentren typisiert. Da aufgrund der Größe des Kollektivs nicht von allen Spendern Daten erfasst werden konnten, wurde im Verlauf eine Selektion vorgenommen, in die nur Spender aufgenommen wurden, deren Daten bekannt waren. Hieraus ergaben sich 534 Nierenspender. Von den Nierenempfängern standen Daten für insgesamt 543 transplantierte Nieren zur Verfügung. Die klinischen Daten der Nierenspender, analysierten postmortal gespendeten Nieren und Empfänger finden sich in den folgenden Tabellen.

Alter (n 534)	52,65 ($\pm 16,98$) Jahre
Geschlecht (n 534)	41,9 % weiblich, 58,1 % männlich
Gewicht (n 257)	78,25 ($\pm 15,89$) kg
Todesursache	57 Spender mit Anoxie 318 Spender mit cerebrovaskulärer Todesursache oder Apoplex

Tabelle 7: Daten des Nierenspenderkollektivs

Alter (n 367)	51,75 ($\pm 12,93$) Jahre
Geschlecht (n 543)	38,9 weiblich 61,2 männlich
Gewicht (n 414)	79,6 ($\pm 16,4$) kg
Kalte Ischämiezeit (n 522)	12,68 ($\pm 5,64$)
PRA	Bei 6,2% über 10%
Calcineurininhibitor (n 528)	Verabreicht bei 85,1%
mTOR Inhibitor (n 523)	Verabreicht bei 5,3%
Antikörperinduktion (n 507)	73%
DGF (n 543)	37,3%

Tabelle 8: Daten des Nierenempfängerkollektivs

Die DGF Rate des gesamten Studienkollektivs betrug 37,3%. Die für unsere Studie als Orientierungsparameter verwendete Kalte Ischämiezeit lag bei durchschnittlich 12,7 Std.

Risikofaktoren für das Auftreten einer Delayed Graft Function im Studienkollektiv

In der folgenden Analyse wurden Risikofaktoren für das Auftreten einer Delayed Graft Function im Studienkollektiv mit Hilfe einer ANOVA untersucht.

	Gesamt	DGF ja	DGF nein	p Wert
Alter Spender (n 534)	52,65 (±16,98)	57,01 (±15,24) (n 199)	50,06 (±17,44) (n 335)	p < 0,001
Gewicht Spender (n 257)	78,25 (±15,89)	78,81 (±15,18) (n 100)	77,90 (±16,37) (n 157)	p= 0,657
PRA (n 502)	2,52 (±10,84)	3,23 (±12,29) (n 189)	2,09 (±9,86) (n 313)	p= 0,256
Alter Empfänger (n 367)	51,75 (±12,93)	54,44 (±12,28) (n 142)	50,05 (±13,11) (n 225)	p= 0,01
Gewicht Empfänger (n 414)	73,14 (±14,55)	75,58 (±14,31) (n 150)	71,75 (±14,48) (n 264)	p= 0,01
Kalte Ischämiezeit (n 522)	12,68 (±5,64)	13,66 (±5,99) (n 193)	12,10 (±5,35) (n 329)	p= 0,002

Tabelle 9: Risikofaktoren für das Auftreten einer Delayed Graft Function

Betrachtet man die oben dargestellten Daten unseres Kollektivs, wird deutlich, dass es sowohl mit Zunahme des Spender- als auch des Empfängeralters zu einer erhöhten Inzidenz einer DGF kommt. Das Gewicht der Spender hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Auftreten einer DGF. Kohärent zu Daten anderer Arbeiten war auch in unserem Kollektiv eine Verlängerung der kalten Ischämiezeit mit einem erhöhten Auftreten einer DGF assoziiert.

Einfluss des Auftretens einer DGF auf den klinischen Verlauf im Studienkollektiv

	Gesamt	DGF ja	DGF nein	p Wert
Dialyse (n 537)	2,34 ($\pm 4,62$)	5,88 ($\pm 5,74$) (n 200)	0,24 ($\pm 1,63$) (n 337)	p<0,001
Kreatinin Tag 28 (n 496)	2,29 ($\pm 1,72$)	3,37 ($\pm 2,30$) (n 171)	1,73 ($\pm 0,92$) (n 325)	p<0,001
Krankenhaustage (n 471)	26,72 ($\pm 15,34$)	34,37 ($\pm 19,07$) (n 175)	22,20 ($\pm 10,25$) (n 226)	p<0,001
GFR Tag 28 (n 334)	41,58 ($\pm 21,49$)	27,59 ($\pm 17,68$) (n 120)	49,42 ($\pm 19,38$) (n 214)	p<0,001
Delta GFR (n 294)	-7,66 ($\pm 26,69$)	-18,20 ($\pm 22,33$) (n 103)	-1,98 ($\pm 27,16$) (n 191)	p<0,001

Tabelle 10: Einfluss einer DGF auf den klinischen Verlauf

In oben dargestellter Tabelle, wurde eine Analyse des klinischen Verlaufs bei Nierenempfängern mit Delayed Graft Function gegenüber Empfängern ohne Delayed Graft Function vorgenommen.

Wie bereits aufgrund der Definition einer DGF zu erwarten ist, zeigt sich in der Gruppe mit DGF ein hochsignifikanter Unterschied bezüglich der postoperativ benötigten Dialysebehandlungen.

Als Marker zur Beurteilung der postoperativen Nierenfunktion diene das Kreatinin im Serum am 28. postoperativen Tag. Dieses war unter den Transplantaten mit DGF hochsignifikant gegenüber den unmittelbar funktionstüchtigen Nieren verändert. Dies spricht für eine deutlich beschleunigte Erholung und verbesserte Nierenfunktion ohne DGF.

Die Krankenhausverweildauer zeigt sich in der Gruppe der DGF positiven Patienten deutlich erhöht. Auch dieser Unterschied war hochsignifikant, und unterstreicht die sozioökonomische Bedeutung der DGF.

3.2 Genetische Untersuchungen

Unter allen Spendern wurde zunächst eine Unterteilung in zwei Gruppen vorgenommen. In die erste Gruppe wurden 20 Spender, bei denen zumindest eine Niere mit einer kalten Ischämiezeit größer 24 Stunden transplantiert wurde, aufgenommen. Bei ihnen war es trotz der hohen CIT nicht zum Auftreten einer DGF gekommen.

In die zweite Gruppe wurden Spender aufgenommen, bei deren Transplantaten es trotz einer kurzen Ischämiezeit kleiner als 12 Stunden zum Auftreten einer DGF gekommen war.

Sequenzierungsanalyse

Bei den Spendern beider Gruppen wurde das EPOR Gen mit seinen 8 Exons komplett sequenziert.

3.2.1 Untersuchung der Spender mit gutem Outcome

3.2.1.1 Mutation Gly46->Glu

In der Spendergruppe mit einer kalten Ischämiezeit über 24 Stunden fand sich bei einem Spender in der Sequenzierung auf Exon 2 eine heterozygote Punktmutation an Position 168. Dabei kommt es zu einer Transition der Base Guanin zu Adenin zur Folge. Dadurch bedingt ist ein Aminosäureaustausch an von Glycin zu Glutaminsäure an Position 46. Es handelt sich somit um eine nichtsynonyme Punktmutation.

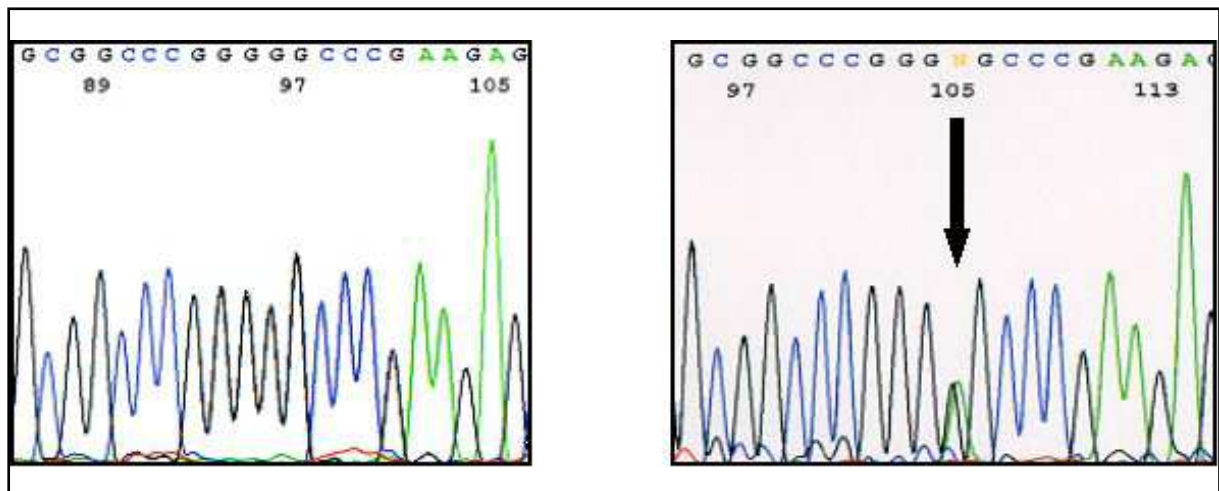
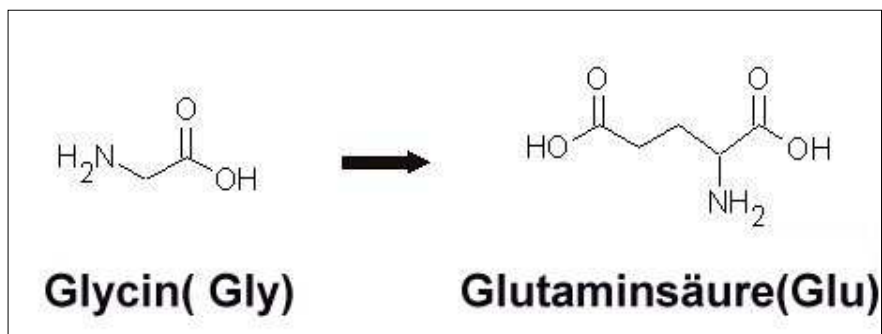


Abbildung 8: linke Seite: Abbildung der Wildtyp Sequenz, rechte Seite: heterozygoter Austausch von Guanin zu Adenin



In den Sequenzierungsuntersuchungen der beiden gebildeten Gruppen fanden sich keine weiteren Träger der gefundenen Mutation.

3.2.1.2 Sequenzalignment

Zur Beurteilung wie bedeutend die Aminosäuresubstitution für die weitere Funktion eines Proteins ist, kann ein Sequenzvergleich zwischen unterschiedlichen Spezies herangezogen werden. Hier zeigt sich, dass die Aminosäure Glycin unter Säugetieren an der Position 46 evolutionär hoch konserviert ist. Dies macht eine Bedeutung für die Rezeptorwirkung wahrscheinlicher.

Spezies	Aminosäuresequenz
Homo sapiens NP_000112	41 LAAR. G .PEELLCFTERLEDLVCFWEEAASAGVGPGN
Mus musculus NP_034279	41 LASR. G .SEELLCFTQRLEDLVCFWEEAASSGMDFN
Macaca mullata XP_001105833	41 LVAR. G .PEELLCFTERLEDLVCFWEEAASAGVSPDN
Rattus norvegicus NP_058698	41 LASR. G .SEELLCFTQRLEDLVCFWEEAANS GMGFN
Sus scrofa NP_999457	41 LAAR. G .PEELLCFTERLEDLVCFWEEAGSAGVGPED

Tabelle 11: Sequenzalignment im Bereich der Sequenzvariation im Exon 2, die Aminosäure Glycin (blau markiert) ist unter den einzelnen Säugetierspezies hoch konserviert, Sequenzen wurden aus der Datenbank der NCBI geladen (Accessionnummer angegeben)

3.2.1.3 Abstandsmatrix

Für die einzelnen Säugetierarten wurde in einem zweiten Schritt nach abgeschlossenem Alignment eine Abstandsmatrix konstruiert. Dabei repräsentieren die einzelnen Zahlen die prozentualen Unterschiede in der Aminosäuresequenz der einzelnen EPOR. Beispielweise liegt zwischen Homo sapiens und Mus musculus ein Unterschiedswert von 0,18 vor. Dies bedeutet, dass sich die Aminosäuresequenz von Mensch und Maus in 18% unterscheidet. Alternativ kann eine Homologie von 82% angenommen werden. Anhand der dargestellten Matrix wird deutlich, dass der EPOR auf evolutionärer Ebene hoch konserviert ist.

	Homo sapiens NP_000112	Mus musculus NP_034279	Macaca mullata XP_001105833	Rattus norvegicus NP_058698	Sus scrofa NP_999457
Homo sapiens NP_000112	0,00	0,18	0,03	0,19	0,15
Mus musculus NP_034279	0,18	0,00	0,18	0,05	0,19
Macaca mullata XP_001105833	0,03	0,18	0,00	0,19	0,16
Rattus norvegicus NP_058698	0,19	0,05	0,19	0,00	0,21
Sus scrofa NP_999457	0,15	0,19	0,16	0,21	0,00

Tabelle 12: Abstandsmatrix EPOR

Abstandsmatrix Exon 2

Eine weitere Abstandsmatrix wurde für Exon 2 erstellt. Hier liegt die gefundene Sequenzvariation G46E.

	Homo sapiens NP_000112	Mus musculus NP_034279	Macaca mullata XP_001105833	Rattus norvegicus NP_058698	Sus scrofa NP_999457
Homo sapiens NP_000112	0,0	0,15	0,08	0,15	0,06
Mus musculus NP_034279	0,15	0,0	0,2	0,04	0,2
Macaca mullata XP_001105833	0,08	0,2	0,0	0,22	0,13
Rattus norvegicus NP_058698	0,15	0,04	0,22	0,0	0,2
Sus scrofa NP_999457	0,06	0,2	0,13	0,2	0,0

Tabelle 13: Abstandsmatrix Exon 2

Betrachtet man die Unterschiede zwischen Mensch, Ratte, Maus und Schwein im Vergleich zur Abstandsmatrix des Gesamtzeptors, so scheint Exon 2 höher konserviert zu sein, als der gesamte EPOR. Dies macht eine wichtige Funktion von Exon 2 im Rahmen des Rezeptors wahrscheinlich und unterstreicht die These einer funktionellen Bedeutung der gefundenen Sequenzvariation.

3.2.1.4 Position der Mutation innerhalb des Rezeptors

Die Abbildung zeigt die beiden EPO Rezeptor Monomere mit Bindung eines Erythropoietinmoleküls. Die Sekundärstruktur des EPOR besteht hauptsächlich aus beta Faltblattmotiven (braun). Dazwischen findet sich eine alpha- Helixstruktur (grün). Dieser direkt

anliegend auf einer verbindenden Schleife liegend, ist die Aminosäure Gly46 gelb hervorgehoben. Hier wurde mittels der Sequenzierung eine Abweichung der Sequenz mit Substitution von Glycin zu Glutaminsäure gefunden. Während Glycin eine neutrale Aminosäure ohne Seitenkette ist, besitzt Glutaminsäure eine negativ geladene Seitenkette. Weitere Überlegungen hinsichtlich des Einflusses auf die Struktur folgen in der Diskussion.

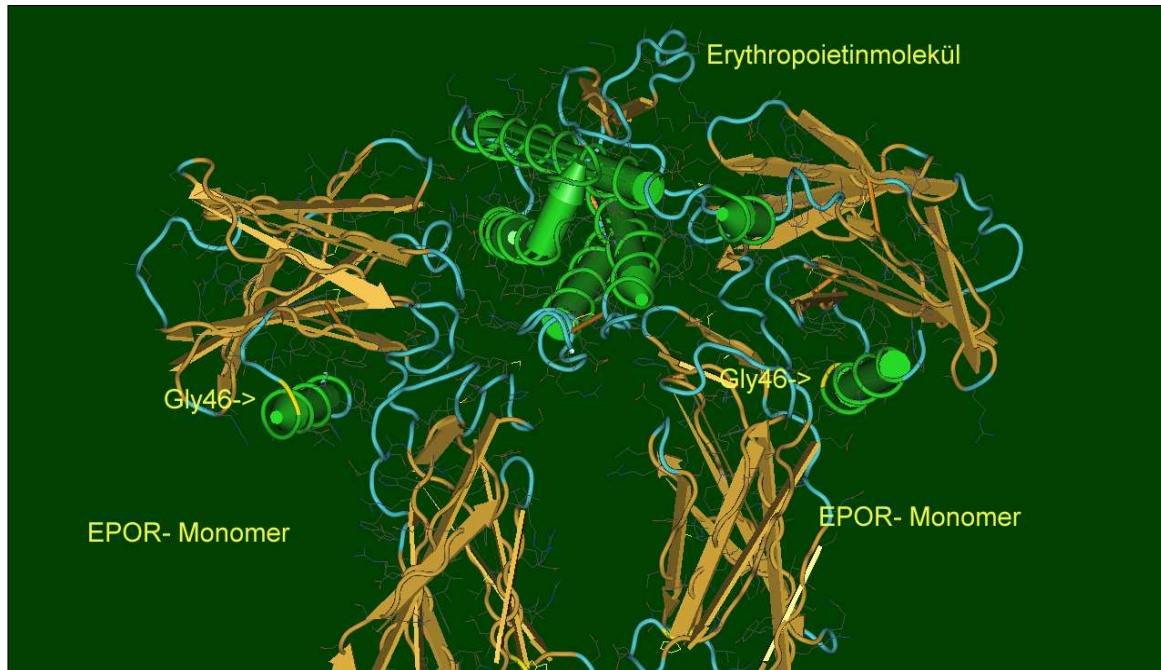


Abbildung 9: Dargestellt ist das EPOR Dimer mit Bindung eines EPO Moleküls, gelb markiert sind die beiden Aminosäure Glycin (Gly46), hier findet sich die gefundene Sequenzvariation auf Exon 2, Gly 46 liegt direkt neben der Alpha- Helix des EPOR Monomers

3.2.1.5 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)

Der gefundene SNP wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym Apa I an allen im Kollektiv vorhandenen Spendern untersucht. Dieses schneidet die DNA- Sequenz an der Stelle **GGGCC↓C**. Innerhalb des Exon 2 existieren zwei Schnittstellen für das Restriktionsenzym Apa I. Durch den Verdau des nach der Amplifizierung 341bp großen Fragments, entstehen beim Wildtyp zwei fast gleich große Fragmente (127bp und 134bp) und ein kleineres Fragment mit einer Größe von 80bp. Die beiden annähernd gleich großen Fragmente sind auf dem

Argarosegel nicht zu unterscheiden und bilden eine gemeinsame Bande. Bei einem heterozygoten Träger der Sequenzvariation kommt es zum Wegfall einer Schnittstelle. Da es sich um einen heterozygoten Träger handelt, stellt sich durch den Schnittstellenwegfall eine zusätzliche Bande mit einer Größe von 214bp dar. Daneben erscheint die 80bp- Bande deutlich schwächer. Bei einem homozygoten Träger der Sequenzvariation wären nur zwei Banden mit Größen von 214bp und 127bp zu erwarten.

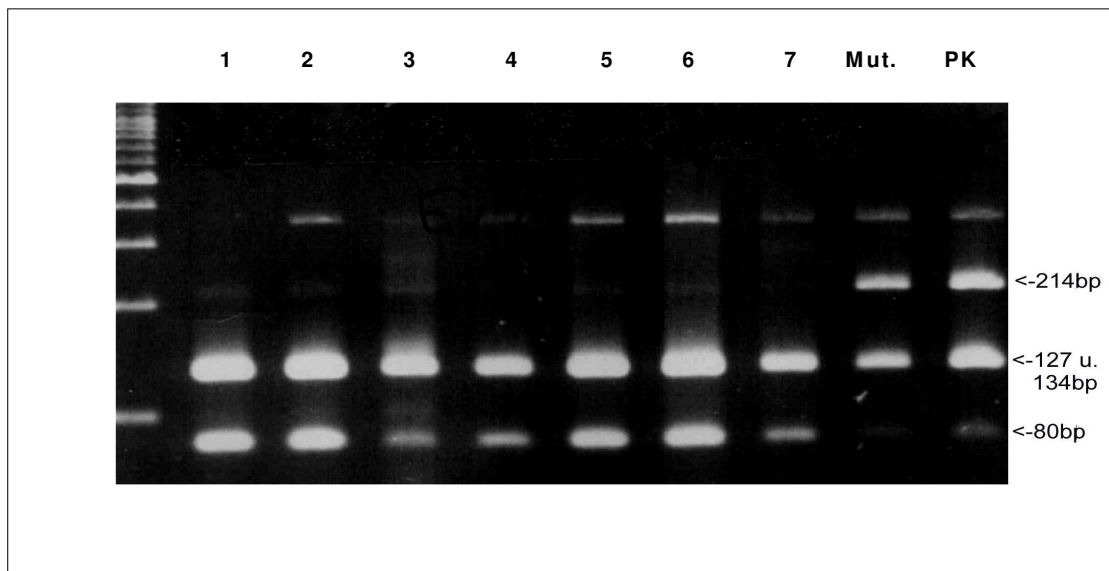


Abbildung 10: Darstellung des Restriktionsverdaus mit Apa I, durch die gefundene Sequenzvariation mit Wegfall einer Schnittstelle kommt eine zusätzliche Bande mit einer Größe von 214bp (Mut.) zur Darstellung; die Banden 1-7 sind Wildtypspender, ganz rechts ist die Positivkontrolle dargestellt

3.2.1.6 Klinische Daten

Indexspender

	Spender
Alter	54 Jahre
Geschlecht	Männlich
Gewicht	84 kg
Ethnizität	Kaukasier
Todesursache	Apoplex

	Niere 1	Niere 2
Empfängeralter	57 Jahre	64 Jahre
CIT	18h	28h
DGF	nein	nein
Calcineurininhibitor	ja	ja
m TOR Inhibitor	nein	nein
HLA Mismatch	nicht bekannt	nicht bekannt
PRA%	0	0
Anzahl der Dialysebehandlungen	0	0
Funktion	gut	gut

**Tabelle 14: Daten der beiden transplantierten Nieren
des Indexspenders**

Wie die oben dargestellte Tabelle zeigt, kam es nach keiner der beiden durchgeführten Transplantationen zum Auftreten einer Delayed Graft Function. Der Spender unterscheidet sich im Alter nicht wesentlich von den weiteren Spendern im Kollektiv. Betrachtet man die kalte Ischämiezeit der transplantierten Nieren, so lag nur die als Niere 2 bezeichnete Niere oberhalb der gesetzten Grenze größer 24 Std. Bei der als Niere 1 bezeichneten Niere lag die kalte Ischämiezeit bei 18 Stunden. Sie lag damit aber ebenfalls über dem errechneten Durchschnitt des Kollektivs von 12,7 Stunden. Auch das Empfängeralter lag deutlich über dem Durchschnittsalter der Empfängerkollektivs.

Gesamtkollektiv

Im Verlauf wurden insgesamt 877 Spender auf die Exon 2 Mutation untersucht. Dabei konnten insgesamt 8 Träger der Mutation identifiziert werden. Im Nierenspenderkollektiv zeigte sich somit eine Prävalenz von 8/877 (0,91%). Angesichts teilweise fehlender klinischer Daten der Spender und Empfänger wurden zur statistischen Analyse nur 534 Spender herangezogen. Hierdurch ergibt sich eine Prävalenz von 8/534 (1,49%). Aus den vorhandenen Daten konnten 12 transplantierte Nieren von Mutationsträgern mit 531 Nieren von Nichtmutationsträgern verglichen werden.

Die tabellarische Analyse findet sich in folgender Tabelle.

	Mutation	Wildtyp	p-Wert
Spenderalter (Jahre)	49,0 ($\pm 14,1$) (n 12)	52,7 ($\pm 17,0$) (n 528)	0,47
Empfängeralter (Jahre)	49,7 ($\pm 13,8$) (n 12)	51,68 ($\pm 13,1$) (n 361)	0,60
Gewicht Spender (kg)	84,0 ($\pm 0,0$) (n 2)	78,2 ($\pm 15,8$) (n 261)	0,60
Gewicht Empfänger (kg)	75,3 ($\pm 15,3$) (n 9)	73,0 ($\pm 14,6$) (n 411)	0,64
Creatinin-Clearance Spender (ml/min)	76,8 ($\pm 17,8$) (n 6)	94,0 ($\pm 38,2$) (n 409)	0,05
Kalte Ischämiezeit (h)	14,5 ($\pm 7,4$) (n 12)	12,6 ($\pm 5,7$) (n 515)	0,25
DGF Inzidenz	33%	38%	0,77
Dialysebehandlungen (Anzahl)	1,1 ($\pm 1,8$) (n 12)	2,4 ($\pm 4,6$) (n 531)	0,35
Kreatinin Tag 28 (mg/dl)	1,6 ($\pm 0,6$) (n 12)	2,3 ($\pm 1,7$) (n 485)	0,16
eGFR (ml/min)	53,8 ($\pm 23,0$) (n 12)	41,1 ($\pm 21,5$) (n 322)	0,045
KH Dauer (d)	19,2 ($\pm 7,9$) (n 11)	27,1 ($\pm 15,8$) (n 476)	0,100
Delta GFR (ml/min)	13,7($\pm 15,9$) (n 6)	-8,1 ($\pm 26,7$) (n 288)	0,047

Tabelle 15: Vergleich der klinischen Daten der Nieren der Wildtypspender mit den Nieren Spender mit gefundener Mutation

Weder Spender- noch Empfängeralter unterschieden sich in unserem Kollektiv.

Betrachtet man die präoperative Kreatininclearance der Spender, so war diese unter den Mutationsträgern niedriger gegenüber den Wildtypspendern. Dieser Unterschied war signifikant.

Die in unserer Studie als wichtiges Kriterium herangezogene kalte Ischämiezeit zeigte sich unter den Mutationsträgern zwar tendentiell verlängert (14,5 vs. 12,6 Std. %). Der Unterschied erwies sich aber gegenüber den Wildtypspendern nicht als signifikant.

Die DGF- Inzidenz lag in der Mutationsträgergruppe niedriger (33% vs. 38%). Der Unterschied war aber ohne statistische Signifikanz. Vergleicht man die Transplantate bezüglich der Anzahl der Dialysebehandlungen, so findet sich auch hier ein Unterschied. Transplantierte Nieren der Mutationsträger zeigen eine niedrigere Rate an benötigten Dialysetherapien nach erfolgter Transplantation.

Passend hierzu findet sich unter den Mutationsträgern auch ein geringerer Wert für das Serumkreatinin am Tag 28 nach Transplantation.

Die für die Einschätzung der postoperativen Nierenfunktion nach der MDRD Formel bestimmte GFR war für die Mutationsträger signifikant gegenüber den Wildtypspendern erhöht.

Das Auftreten einer DGF stellt aufgrund der zusätzlich entstehenden Kosten einen wichtigen ökonomischen Faktor dar. Dieser drückt sich in einer Verlängerung der Krankenhausverweildauer unter den Wildtypspendern aus. Allerdings war dieser Unterschied ohne statistische Signifikanz ($p > 0,1$).

3.2.1.7 Weiterführende Untersuchungen der Gly46->Glu Variante

3.2.1.7.1 Kontrollkollektiv

Zusätzlich zum Spenderkollektiv wurde ein Kontrollkollektiv aus der Abteilung für Molekularbiologie des Instituts für Klinischen Chemie der Ludwig Maximilians Universität München, bestehend aus 100 Männern und 100 Frauen untersucht. Im Kontrollkollektiv befinden sich Proben, die von Patienten und Verwandten aufgrund anderer genetischer

Fragestellungen gesammelt wurden. Zu diesen gehörten Thrombophilieneigung, der Ausschluss einer Hämochromatose und andere seltenere Krankheitsbilder.

Im Kontrollkollektiv konnten mit Hilfe des RFLP vier weitere Träger des G/A Austausches gefunden werden, so dass sich hier eine Prävalenz von 4/200 (2%) ergab. Dies verdeutlicht die Tatsache, dass die gefundene Sequenzvariation insgesamt selten ist.

Kontrollkollektiv

Wildtyp	196/200 (98%)
Heterozygote	4/200 (2%)
Homozygote	0/200 (0%)

Tabelle 16: Kontrollkollektiv

3.2.1.7.2 Thrombophiliekollektiv

Bei drei der vier Träger der Exon 2- Sequenzvariation des Kontrollkollektivs, war ursprünglich aufgrund eines tromboembolischen Ereignisses eine Thrombophiliediagnostik auf die Faktor V Leiden Mutation und die Prothrombinmutation erfolgt, welche nicht nachweisbar waren.

Um eine Häufung und damit mögliche Assoziation zwischen der von uns gefundenen EPOR-Mutation und klinisch aufgetretenen thromboembolischen Ereignissen zu prüfen, wurden weitere 60 Proben untersucht, bei denen keine weiteren Mutationsträger gefunden werden konnte.

Thrombophiliekollektiv

Wildtyp	60/60 (100%)
Heterozygot	0/60 (0%)
Homozygot	0/60 (0%)

Tabelle 17: Thrombophiliekollektiv

3.2.1.8 Leistungssportler Kollektiv

Aufgrund der Ergebnisse im Nierenspenderkollektiv und der hieraus folgenden Annahme, dass die Exon 2 Mutation zu einer Beeinflussung des Ischämieschadens und Verbesserung der postoperativen Nierenfunktion führen könnte, wurde ein weiteres Kollektiv zur Bestätigung der gemachten Beobachtungen untersucht. Hierzu wurde ein vom Zentrum für Prävention und Sportmedizin der Technischen Universität München verwaltetes Kollektiv verwendet. Dieses setzte sich aus Hochleistungssportlern und Kontrollpersonen zusammen. Als Marker für die Leistungsfähigkeit fungiert die VO_{2max} . Diese betrug bei den Hochleistungssportlern mindestens 75ml/kg/min^{-1} während die VO_{2max} der Kontrollen unter 50ml/kg/min^{-1} betrug. Die Bestimmung der VO_{2max} war bereits durch das Institut durchgeführt worden. Das Kollektiv der Hochleistungssportler setzte sich aus Langläufern, Radfahrern, Biathleten, Läufern und anderen Ausdauersportlern zusammen, die alle an nationalen oder internationalen Wettbewerben teilgenommen hatten.

Unter den Hochleistungssportlern ließen sich mittels des Restriktionsverdaus 9 heterozygote Träger der Exon 2 Mutation identifizieren.

In der Kontrollgruppe fanden sich 4 heterozygote Träger. Homozygote Träger fanden sich in keiner der beiden Gruppen.

	Sportler VO_{2max} $>75\text{ml/kg/min}^{-1}$	Kontrollen VO_{2max} $<50\text{ml/kg/min}^{-1}$	Gesamt
Wildtyp	308	316	624
Heterozygote Träger	9	4	13
Gesamt	317	320	637

Tabelle 18: Heterozygote Träger

Die Prävalenz der Exon 2 Mutation unter des Sportlern beträgt

$$9 \times 100 / 317 = 2,84\%$$

Die Prävalenz der Exon 2 Mutation unter den Kontrollen beträgt

$$4 \times 100 / 320 = 1,25\%$$

Zwar zeigt sich hier ein Unterschied zugunsten der Sportler. Eine statistische Signifikanz konnte aber nicht nachgewiesen werden (**Fisher Exact Test $p=0,173$**).

3.2.2 Untersuchung der Spender mit schlechtem Outcome

3.2.2.1 Variation His161-> Arg

In der Gruppe der Spender mit einer aufgetretenen DGF trotz einer kalten Ischämiezeit kleiner 12 Stunden, zeigte sich bei zwei Spendern eine heterozygote Punktmutation in Exon 4. Hierbei kommt es zu einer Transition von Adenin zu Guanin. Dadurch verändert sich der Code von Cytosin-Adenin- Cytosin (CAC) zu Cytosin- Guanin- Cytosin (CGC).

Dies verursacht einen Austausch der Aminosäuren Histidin zu Arginin an der Aminosäureposition 161 des EPO Rezeptors. Es handelt sich also um eine nichtsynonyme Punktmutation.

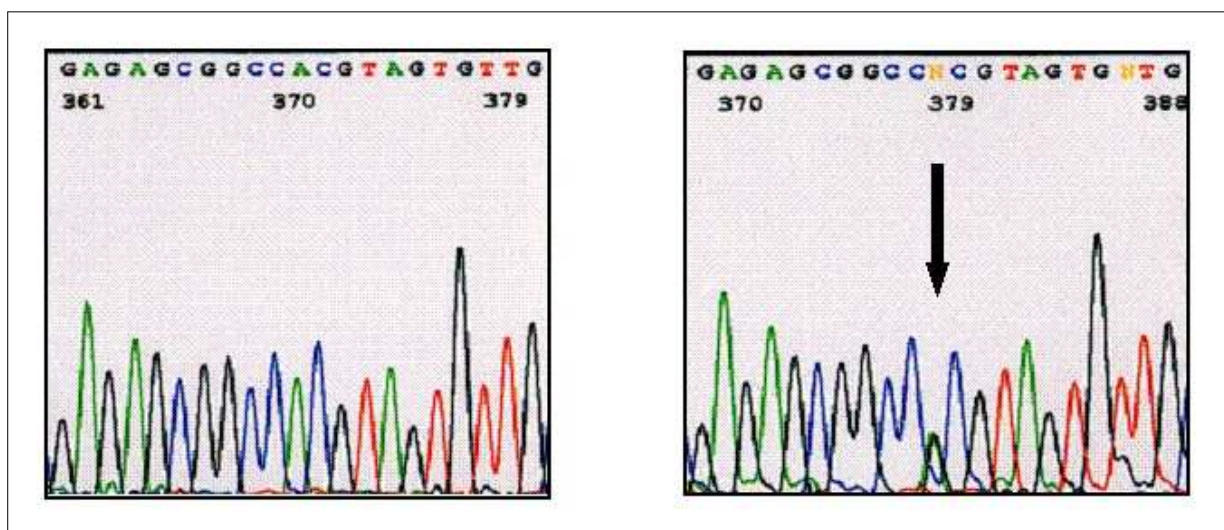
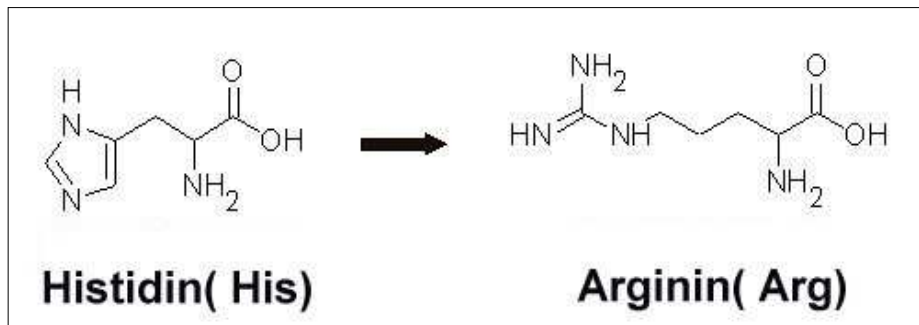


Abbildung 11 zeigt auf der linken Seite die Sequenz des Wildtyps, auf der rechten Seite ist die heterozygote Variation mit Austausch von Adenin zu Guanin dargestellt



Unter den weiteren Spendern mit schlechtem Outcome, konnten keine weiteren Mutationsträger gefunden werden.

3.2.2.2 Sequenzalignment

Zur Beurteilung wie bedeutend eine Aminosäuresubstitution für die weitere Funktion eines Proteins ist, kann zunächst ein Sequenzvergleich zwischen unterschiedlichen Spezies herangezogen werden. Hier zeigt sich, dass die Aminosäure Histidin unter Säugetieren an der Stelle 161 hoch konserviert ist.

Homo sapiens	154 RLADESG. H .VVLRW.LPPPETPMTSHIRYEVDVS
Mus musculus	152 RRAEEGS. H .VVLRW.LPPPGAPMTTHIRYEVDVS
Macaca mullata	154 RLADEGG. H .IVLRW.LPPPEAPMTSHIRYEVDVS
Rattus norvegicus	153 RRAEEGS. H .VVLRW.LPPPGAPMTTHIRYEVDVS
Sus scrofa	155 RRAEESG. H .VVLRW.LPPPGAPMASLIRYEVNIS

Tabelle 19: Sequenzalignment im Bereich der Sequenzvariation im Exon 4, die Aminosäure Histidin (blau markiert) ist unter den einzelnen Säugetierspezies hoch konserviert

3.2.2.3 Abstandsmatrix Exon 4

Auch für Exon 4 wurde eine Abstandsmatrix unter den einzelnen Spezies entworfen.

	Homo sapiens NP_000112	Mus musculus NP_034279	Macaca mullata XP_001105833	Rattus norvegicus NP_058698	Sus scrofa NP_999457
Homo sapiens NP_000112	0,0	0,22	0,05	0,22	0,28
Mus musculus NP_034279	0,22	0,0	0,21	0,00	0,23
Macaca mullata XP_001105833	0,05	0,21	0,0	0,21	0,30
Rattus norvegicus NP_058698	0,22	0,00	0,21	0,0	0,23
Sus scrofa NP_999457	0,28	0,23	0,30	0,23	0,0

Tabelle 20: Abstandsmatrix Exon 4

Hier zeigt sich insgesamt im Vergleich zwischen Mensch und den übrigen Spezies eine geringere Konservierung, was für eine höhere evolutionäre Variabilität spricht. Dagegen ist die Aminosäure Histidin 161 unter allen Spezies konserviert, was ein Hinweis für eine wichtige Bedeutung im Rezeptor ist.

3.2.2.4 Position der Mutation innerhalb des Rezeptors

Abgebildet ist die Lage von Histidin im EPO- Monomer. Man erkennt dabei die beiden aromatischen Seitenketten (gelb markiert). Durch eine Substitution von Histidin zu Arginin, kommt es zum Wegfall der aromatischen Seitenkette. Stattdessen wird mit Arginin eine aliphatische Aminosäure eingefügt.

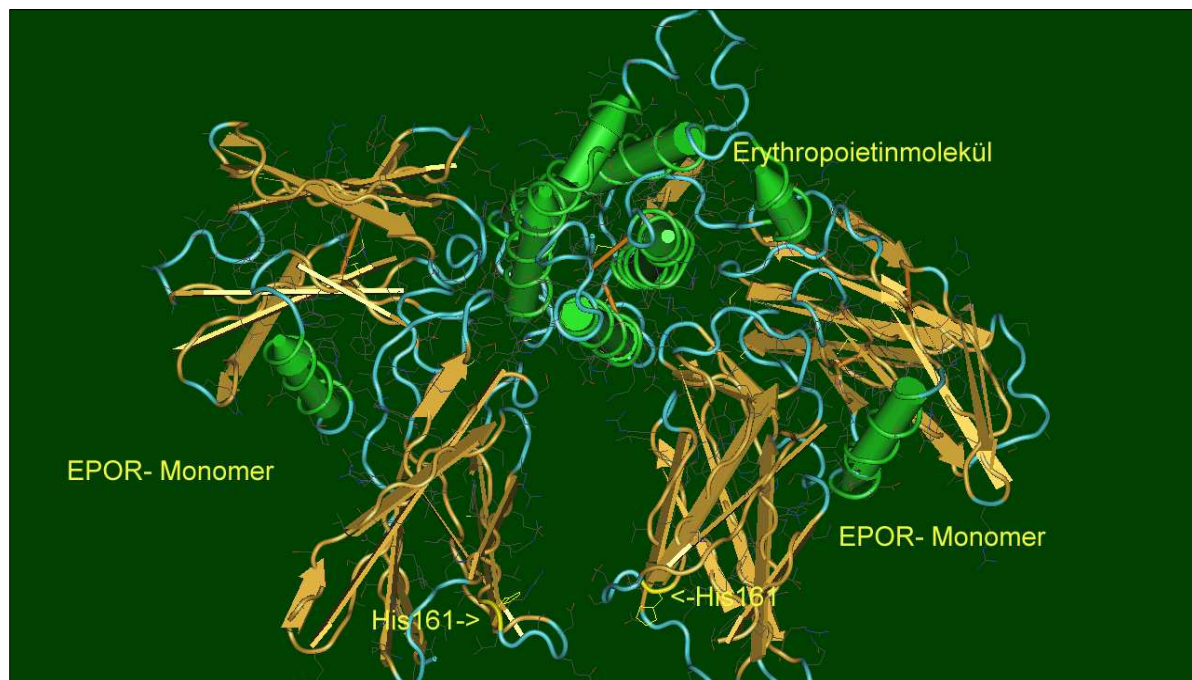


Abbildung 12 zeigt die Tertiärstruktur der beiden EPOR-Monomere mit Bindung eines EPO Moleküls, gelb markiert ist die Aminosäure Histidin 161 des Exon 4 in der sich eine heterozygote Sequenzvariation mit Austausch zu Arginin fand;

3.2.2.5 Restriktionfragmentlängenpolymorphismus

Der gefundene SNP wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym Not I an allen im Kollektiv vorhandenen Spendern untersucht. Dieses schneidet die DNA- Sequenz an der Stelle **GC↓GGCCGC**. Durch die Punktmutation von Adenin zu Guanin entsteht eine Schnittstelle, die als Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym dient. Nach Verdau des 628bp großen PCR- Fragments, entstehen daher bei Heterozygoten zwei zusätzliche Banden mit einer Größe von 399bp und 299bp. Beim Wildtyp stellt sich dagegen nur die ursprüngliche Bande

dar. Bei einem homozygoten Träger dürften sich dagegen nur die beiden kleineren Banden zeigen.

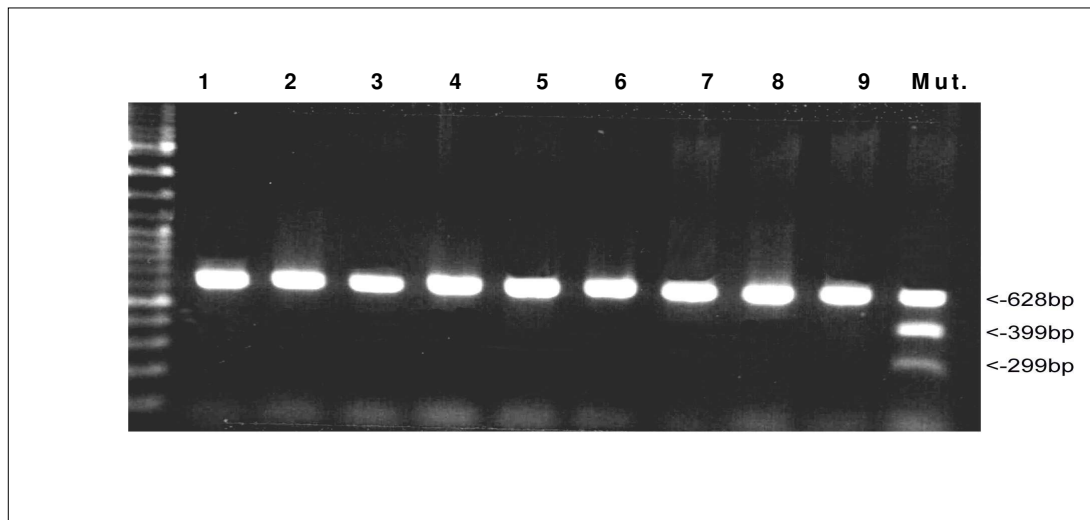


Abbildung 13 zeigt einen Restriktionsverdau mit Not I, durch die heterozygote Variation (ganz rechts) kommt es zur Entstehung einer zusätzlichen Schnittstelle innerhalb der Sequenz, diese führt zu zwei zusätzlichen Banden mit der Größe von 399bp und 299bp;

In dem zu Beginn der Studie untersuchten Kollektiv von 280 Nierenspendern konnten insgesamt zwei Mutationsträger identifiziert werden. Die Mutation wurde im Verlauf nicht weiter an den zusätzlich generierten Spendern getestet.

Nach Restriktionsverdau

Genotyp

Wildtyp	278/280 (99,28%)
Heterozygote	2/280 (0,72%)
Homozygote	0/280 (0%)

Tabelle 21: Genotyp

3.2.2.6 Klinische Daten

Beschreibung der Indexspender

Bei zwei Spendern fand sich die heterozygote, nicht synonyme Sequenzvariation mit Austausch von Histidin 161 zu Arginin.

Die folgende Tabelle zeigt die Daten der beiden Spender

Daten der Index Spender

	Spender 1	Spender 2
Alter	55 Jahre	59 Jahre
Geschlecht	männlich	weiblich
Gewicht	95 kg	62 kg
Ethnizität	Kaukasier	Kaukasier

Tabelle 22: Daten der Index Spender

Vergleich der Nierentransplantate

	Spender 1		Spender 2	
	Niere 1	Niere 2	Niere 1	Niere 2
CIT	11,5	36	8,5	10
DGF ja/ nein	ja	ja	nein	ja
Calcineurininhibitor	ja	ja	ja	ja
M TOR Inhibitor	nein	nein	nein	ja
HLA Mismatch	4	5	2	2
PRA%	0	0	0	0
Anzahl der Dialysebehandlungen	20	1	keine	4
Funktion	gut	eingeschränkt	Akute Abstoßung	gut
Anzahl der Krankenhaustage	33	53	Nicht bekannt	19

Tabelle 23: Vergleich der Nierentransplantate

Die in Exon 4 gefundene Mutation konnte bei zwei Spendern detektiert werden. Die Tabellen zeigen die Aufschlüsselung bezüglich beider transplantierten Nieren.

Bei Indexspender 1 lag nur bei der Transplantation der als Niere 1 bezeichneten Niere eine CIT <12h vor. Bei der zweiten Niere lag dagegen eine deutlich verlängerte kalte Ischämiezeit von 36h vor. Bei beiden Nieren kam es zum Auftreten einer DGF.

Beim Indexspender 2 lag bei den Transplantationen beider Nieren die kalte Ischämiezeit unter 12h. Hier kam es nur bei der als Niere 2 bezeichneten Niere zu einer DGF. Bei Niere 1 fand sich hingegen eine akute Abstoßungsreaktion.

Betrachtet man das Kollektiv, so lagen beide Spender im Vergleich über dem Durchschnittsalter aller Spender. Weiterhin findet sich bei Spender 1 ein erhöhtes HLA Mismatch, was einen zusätzlichen Einfluss auf den Erfolg der Transplantation ausübt.

3.2.2.7 Untersuchungen an weiteren Kollektiven

3.2.2.7.1 Kontrollkollektiv

Unter den 200 Kontrollpersonen fanden sich keine weiteren Träger der Exon 4- Mutation.

3.2.2.7.2 Untersuchung im Sportlerkollektiv

Auch die Exon 4 Mutation wurde in dem beschriebenen Sportlerkollektiv mit Hilfe des Restriktionsfragmentpolymorphismus untersucht. Weder unter den untersuchten 317 Sportlern, noch unter den untersuchten 320 Kontrollpersonen fanden sich weitere Träger der Mutation.

3.2.3 Sequenzierung der weiteren Exons und Introns

Die Sequenzierungsuntersuchung der initial ausgewählten Spender erbrachte keine weiteren Sequenzvariationen. Insbesondere im bei der familiären Erythrozytose beeinflussten Exon 8 konnten durch die Untersuchungen keine Veränderungen detektiert werden. Dies spricht für die insgesamt hohe Konservierung des EPOR- Gens.

4 Diskussion

4.1 Allgemeines

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem Kollektiv von Nierenspendern ein neuer, zuvor nicht beschriebener Polymorphismus im Gen des Erythropoietinrezeptors (EPOR) gefunden. Dieser wurde weiterhin in zwei Kollektiven aus Leistungssportlern und Sportlern nachgewiesen. Daneben wurde im Nierenspenderkollektiv ein weiterer, bislang nicht beschriebener Polymorphismus gefunden. Inwieweit die gefundenen Ergebnisse real sind, und welchen möglichen Einfluss sie auf pathophysiologische Konzepte haben, soll im Folgenden diskutiert werden. Dabei müssen auch Aspekte der Methodik angesprochen werden.

4.2 Diskussion der Methodik

4.2.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden zur Identifizierung von Mutationen im EPOR- Gen umfassten die Polymerasekettenreaktion, den Restriktionsfragmentpolymorphismus und die Sequenzierungsanalyse. Um eine Optimierung der Arbeitsmethoden zu gewährleisten ist es notwendig bestimmte Prinzipien einzuhalten.

Die PCR erlaubt es ein bestimmtes DNA- Fragment zu vervielfältigen, um diese für weitere Analysen zu benutzen. Mit Hilfe der PCR wurden in dieser Arbeit die benötigten Exonabschnitte des EPOR vervielfältigt.

Die PCR stellt ein Verfahren mit hoher Sensitivität und Spezifität dar. Die hohe Sensitivität bedingt allerdings eine hohe Anfälligkeit gegenüber Kontaminationen. Da sie wie beschrieben den ersten Schritt vor einer Weiterverarbeitung darstellte, musste hier das Kontaminationsrisiko so gering als möglich gehalten werden. Insbesondere gilt es eine Kontamination mit Fremd- DNA auszuschließen. Dabei wurde bei jeder PCR neben den gewünschten Spenderproben eine Negativkontrolle mitgeführt. Diese bestand aus Wasser und

dem Mastermix. Eine Verunreinigung kann dann durch Analyse auf dem Agarosegel ausgeschlossen werden. Die DNA wurde bei den Experimenten erst im letzten Schritt hinzupipettiert.

Ein weiterer wichtiger Schritt war die Wahl der Hybridisierungstemperatur, da diese die Spezifität der Methode beeinflussen kann. Wählt man diese zu hoch kommt es nicht zur Anlagerung des Primers an die Matrize. Wird diese dagegen zu niedrig gewählt sind Fehlpaarungen zwischen Primer und Matrize möglich, was zu Vervielfältigungen an unerwünschten Stellen der Matrize führen kann. Die unspezifischen Amplifikate können des Weiteren auch durch eine zu hohe Konzentration der zugesetzten Taq Polymerase entstehen. Für unsere Experimente wurde orientierend an der kalkulierten Schmelztemperatur T_m eine Annealingtemperatur von 62 °Grad Celsius gewählt.

Einen weiteren Faktor für den Erfolg der PCR stellte das Design der Primer dar. Dabei müssen komplementäre Sequenzen innerhalb der Primer vermieden werden, um eine Anlagerung zwischen den Primern in Form von Dimeren auszuschließen, da diese sonst für die Amplifikation verloren gehen könnten. Eine weitere Frage ist die Länge der verwendeten Primer. Sie darf zum einen nicht zu kurz sein um eine Vermehrung falscher DNA- Abschnitte zu verhindern. Dagegen führt ein zu langer Primer zu einer zu langsamen Anlagerung an die DNA- Matrize, was zu einer verminderten Effizienz der PCR führen kann. Für unsere Versuche wurden Primer mit einer Länge von 21- 24 Nukleotiden verwendet.

Durch die Taq Polymerase kommt es in 10^{-4} bis 10^{-5} Fällen zum Fehleinbau falscher Nukleotide. Dies kann zu einer exponentiellen Vervielfältigung falscher Produkte führen. Um diese Missinkorporationsrate zu verringern, sollte die Rate der unterschiedlichen dNTPs gleich hoch sein (Innis, Myambo et al. 1988). In unseren Experimenten wurde ein fertiger dNTP Mix mit gleichen Anteilen aller vier Nukleotide verwendet.

Nach Erhalt des PCR Produktes wurde dieses mittels der automatischen DNA- Sequenzierung weiter analysiert. Prinzipiell stellt diese ein Verfahren von hoher Spezifität dar. Allerdings kann es in der Auswertung der Sequenzen aufgrund von unspezifischen Hintergrundsignalen zu Schwierigkeiten kommen. Insbesondere die Detektion heterozygoter Allelträger kann aufgrund dieser Hintergrundsignale erschwert sein. In unserer Arbeit wurden die Sequenzierung bei heterozygoten Allelträgern daher zur Bestätigung auch in die Gegenrichtung durchgeführt.

Die Tatsache, dass im menschlichen Genom Nukleotidaustausche vorkommen, wird durch die Methode des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) genutzt. In der vorliegenden Arbeit wurden die durch die Sequenzierung gefundenen Polymorphismen durch den

Restriktionsverdau an mehreren Kollektiven überprüft. Ausgangspunkt für den Verdau war wieder das PCR Produkt, so dass die oben genannten, die PCR beeinflussenden Faktoren hier bereits eine wichtige Rolle spielen. Insbesondere Kontaminationen müssen vermieden werden. Auch hier wurde durch Negativkontrollen eine Kontamination überprüft. Weiterhin wurde bei jedem Versuchsansatz die detektierte Heterozygotenprobe als Positivkontrolle für einen erfolgreichen Verdau mitgeführt.

Auch beim Versuchsansatz müssen bestimmte Faktoren beachtet werden, um die Spezifität der Restriktionendonukleasen zu gewährleisten. Hierzu gehört die Verdautemperatur, da eine falsche Versuchstemperatur zu einem fehlenden Verdau führen und so eine fehlende Schnittstelle vortäuschen kann. Weiterhin müssen der benutzte Puffer und die Restriktionszeit eingehalten werden. Eine zu lang gewählte Reaktionszeit kann zu einem unspezifischen Verdau führen. Die Reaktionsbedingungen waren in unserem Fall vom Hersteller vorgegeben. Die Verdautemperatur wurde über einen Thermocycler gewährleistet.

Zuletzt wurden die Verdauprodukte elektrophoretisch aufgetrennt. Hier muss zum einen eine ausreichende Laufzeit, zum anderen auf eine ausreichende Qualität des verwendeten Gels geachtet werden. Dabei wird eine verbesserte Qualität durch eine Steigerung der Agarosekonzentration des Gels erreicht. In unserem Fall wurden zweiprozentige Agarosegele verwendet. Zur Identifizierung der erhaltenen Banden wurde vor dem Auftragen die Größe der erwarteten Bandengröße bestimmt und mit den erhaltenen Banden verglichen.

4.2.2 Kollektive

4.2.2.1 Transplantatspenderkollektiv

Für die Analyse genetischer Veränderungen am EPOR in Korrelation zu einer DGF wurde ein Kollektiv von 877 postmortalen Nierenspendern untersucht. Hierbei ist darauf hinzuweisen, dass genetische Untersuchungen an Nierenspendern seltener sind, als an Transplantatempfängern, da die Rekrutierung der Spenderproben mit einem vergrößerten Aufwand verbunden ist.

Die DGF- Rate betrug im untersuchten Kollektiv 37,3 %. Ein Vergleich mit anderen Studien bezüglich der Prävalenz einer DGF ist aufgrund der in der Einleitung beschriebenen

unterschiedlichen Definitionen und Spenderkriterien schwierig. In unserem Kollektiv handelte es sich bei den Spendern ausschließlich um Heartbeating- Donors. Wie oben erwähnt wurde die Dialysenotwendigkeit zur Identifikation einer DGF herangezogen, weil diese die häufigste in der Literatur verwendete Definition der DGF darstellt. Anhand der Häufigkeit in unserem Kollektiv wird in jedem Fall deutlich, dass die DGF eine wichtige Komplikation der Nierentransplantation darstellt.

Zur Detektierung besonders geeigneter Spenderkandidaten wurden diese in zwei Gruppen unterteilt. So stellte die erste Gruppe Spender dar, bei denen es trotz einer deutlich verlängerten kalten Ischämiezeit keine DGF aufgetreten war. Als Cut Off Wert wurde hierfür eine Dauer der kalten Ischämiezeit von 24h gewählt. Auf die entscheidende Bedeutung der kalten Ischämiezeit wurde in der Einleitung bereits hingewiesen. In einer Studie von Ojo et al an einem Kollektiv von 37.216 Nierenspendern verdoppelte sich das Risiko für das Auftreten einer DGF ab einer kalten Ischämiezeit >24h. Dagegen war eine CIT kleiner gleich 12 Stunden mit keiner wesentlichen Erhöhung der Odds Ratio für eine DGF verbunden (Ojo, Wolfe et al. 1997). Somit wurden in die zweite Gruppe Spender eingeschlossen, bei deren Transplantation es zum Auftreten einer DGF trotz einer Ischämiezeit kleiner 12 Stunden gekommen war.

Die Strategie Spender zu wählen, bei denen die CIT besonderen Ausreißern unterlag, gründete in der Tatsache, dass bei diesen eine Prädiktion trotz sonstiger standardisierter Variablen, nicht möglich war. Diese schienen daher für genetische Untersuchungen besonders geeignet. Somit wurde der EPOR nur von diesen Spendern komplett sequenziert. Nach Auffinden von bisher nicht beschriebenen Polymorphismen in beiden Gruppen wurden keine weiteren Spender mehr sequenziert und das gesamte Kollektiv ausschließlich auf die gefundenen Polymorphismen untersucht. Nachteil dieser Strategie ist, dass mögliche weitere Polymorphismen im EPOR Gen bei den übrigen Spendern nicht detektiert wurden. Allerdings waren zum Zeitpunkt der Durchführung der Laboruntersuchungen nur wenige Veränderungen im EPOR Gen beschrieben, so dass wir uns auf die gefundenen Polymorphismen konzentrierten.

Aufgrund der Größe des Kollektivs waren nicht von allen Spendern und Empfängern sämtliche klinische Daten vorhanden, so dass für die statistischen Analysen nur Spender und Empfänger herangezogen worden, deren klinischer Verlauf bekannt war. Es standen dabei die Daten von insgesamt 534 Spendern zur Verfügung. Die Empfängerdaten waren nur von insgesamt 543 Nieren zu erhalten.

Letztlich muss aufgrund dieser Vorgehensweise das Auftreten eines Selektionsbias diskutiert werden. Dieser entsteht durch einen systematischen Fehler bei der Rekrutierung des Studienkollektivs.

Betrachtet man die erhobenen Daten in unserem Kollektiv und vergleicht diese mit der Publikationen über die Delayed Graft Function, so decken sich unsere Daten sowohl hinsichtlich der Inzidenz einer DGF, die zwischen 25-40% angegeben wird (Peeters and Vanholder 2008), als auch den vorhandenen Risikofaktoren. Auch das klinische Outcome nach dem Auftreten einer DGF entsprach in unserem Kollektiv, dem in der Literatur beschriebenen. Dies lässt darauf schließen, dass die in unserer Studie erhobenen Daten als statistisch valide zu betrachten sind.

4.2.2.2 Sportlerkollektiv

Die gefundenen Sequenzvariationen wurden zur Einordnung der Bedeutung an einem weiteren Kollektiv untersucht. Hierfür diente ein vom Zentrum für Prävention und Sportmedizin der TU München im Rahmen der Genathlete- Studie rekrutiertes Kollektiv. Dabei handelte es sich um 317 Leistungssportler und 320 Kontrollen. Diese waren ausschließlich kaukasische, junge Männer. Um eine Vergleichbarkeit der von Probanden und Kontrollen zu gewährleisten, wurde auch die regionale Herkunft berücksichtigt. So waren in beiden Gruppen deutsche, finnische und nordamerikanische Testpersonen zu nahezu gleichen Anteilen vertreten. Die Gruppe der Leistungssportler setzte sich aus Vertretern unterschiedlicher Ausdauersportarten wie Radfahrern, Biathleten, Läufern und Langläufern zusammen. Als Unterscheidungskriterium zwischen Sportlern und Kontrollen diente die VO₂max. Diese bezeichnet die maximale Menge an Sauerstoff in ml/kg/min⁻¹, die von einem Individuum unter maximaler körperlicher Anstrengung aufgenommen werden kann. Sie gilt als „Bruttokriterium“ der kardio-pulmonal-metabolischen Kapazität, da sie alle an der Leistungserbringung beteiligten Mechanismen umfasst. Hierzu gehören die äußere Atmung, der Gasaustausch in der Lunge, das Herzzeitvolumen (HZV), der O₂-Transport im Blut, die belastungsgerechte Verteilung des HZV, sowie die Sauerstoff-Aufnahme der Arbeitsmuskulatur (Meyer T. 1999). Die VO₂max wird in Studien als wichtige Messgröße für die aerobe Leistungsfähigkeit, was sie als Untersuchungsparameter attraktiv macht (Bouchard, Dionne et al. 1992). Eine genetische Komponente der Ausdauerleistungsfähigkeit wird bereits lange angenommen. Durch Zwillingsstudien und Familienstudien konnten diese Annahme bestätigt werden (Lesage, Simoneau et al. 1985; Fagard, Bielen et al. 1991). Berücksichtigt man die Faktoren Alter, Geschlecht, Körpergewicht und Körperzusammensetzung, wird heute ein genetischer Anteil an der Ausprägung des Phänotyps VO₂max von 25-40% angenommen (Bouchard, Daw et al. 1998). Daneben scheint auch die Trainierbarkeit der VO₂max genetisch determiniert zu sein. In Zwillingsstudien fand sich eine deutliche Korrelation des Trainingszuwachses unter

verwandten Personen bei gleichzeitig durchschnittlichem Trainingszuwachs der VO₂max von 15-25% (Prud'homme, Bouchard et al. 1984; Hamel, Simoneau et al. 1986).

Man geht heute davon aus, dass sich die VO₂max um durchschnittlich 20-40% durch Ausdauertraining steigern lässt (Bouchard, Boulay et al. 1988). Für die Auswahl des Kollektivs spielt dies eine große Rolle. So wurde für die Leistungssportler ein Grenzwert $\geq 75 \text{ ml/kg/min}^{-1}$ gewählt, während bei den Kontrollen die VO₂max $\leq 50 \text{ ml/kg/min}^{-1}$ betrug. Stellt man die hypothetische Überlegung an, dass die Kontrollpersonen ihre VO₂max durch Ausdauertraining um maximal 40% steigern würden, läge der erreichte Wert von $70 \text{ ml/kg/min}^{-1}$ immer noch 5 ml/kg/min^{-1} unter dem Grenzwert für die Athleten. Somit wären selbst die leistungsfähigsten Kontrollpersonen nicht in der Lage in die Athletengruppe vorzustoßen. Somit erlaubte diese Unterteilung der beiden Gruppen eine ausreichende Trennung.

Da die Athleten in dieser Studie eine durchschnittliche VO₂max von $79 \text{ ml/kg/min}^{-1}$ und die Kontrollgruppe durchschnittlich von $39 \text{ ml/kg/min}^{-1}$ erreichte, waren die beiden Gruppen noch deutlicher voneinander abzugrenzen.

4.2.3 EPOR als Kandidatengen

4.2.3.1 EPOR im Nierenspenderkollektiv

Die Frage, ob und welche genetische Veränderungen seitens des Spenders und Empfängers eine Prädiktion bezüglich des Auftretens einer Delayed Graft Function zulassen, ist bisher nicht geklärt. Die Beobachtung, dass der Erfolg einer Nierentransplantation unter anderem der Ethnizität unterliegt, macht den Einfluss genetischer Unterschiede wahrscheinlich. So wurde bereits darauf hingewiesen, dass Nieren afroamerikanischer Spender ein schlechteres Transplantatüberleben zeigen, als Nieren kaukasischer Spender (Cosio, Qiu et al. 1996).

Das Wissen um genetische Risikofaktoren des Spenders vor einer Transplantation wäre insofern bedeutend, da hierdurch eine Vorhersage bezüglich der Wahrscheinlichkeit einer DGF getroffen werden könnte.

Damit wäre es möglich, andere Risikovariablen vor der Transplantation soweit zu optimieren, dass eine DGF unwahrscheinlicher wird. Des Weiteren könnte gegebenenfalls bei bestimmten die Pathogenese beeinflussenden Mechanismen spezifisch eingegriffen werden.

Um nach Suszeptibilitätsgenen zu suchen, gibt es grundsätzlich zwei unterschiedliche Methoden. Die Kandidatengenanalyse setzt das Verständnis der Pathophysiologie einer Erkrankung voraus. Aus einer Hypothese, werden daher bestimmte Gene ausgewählt, die eine Rolle bei der DGF spielen könnten.

Für die zweite Methode wird das Genom des Menschen systematisch auf Auffälligkeiten der DNA-Basensequenz untersucht wie zum Beispiel auf sich wiederholende Basensequenzen. Durch Ermittlung einer möglichen Korrelation zwischen der Erkrankung und einer oder mehrerer dieser zahlreichen polymorphen Auffälligkeiten der DNA (sogenannter DNA-Marker), die in Abständen über das gesamte Genom verteilt vorkommen, kann ein bestimmter Genort innerhalb eines Chromosoms ausfindig gemacht werden, und damit auch Gene, die in der Entstehung der DGF eine Rolle spielen könnten.

Im Gegensatz zur Kandidaten-Gen-Analyse wird bei dieser Methode im Voraus keine Hypothese zur Pathophysiologie der Erkrankung benötigt, um Pathomechanismen der Krankheitsentstehung zu identifizieren, da einfach nur überprüft wird, ob sich zufällig diese auffälligen DNA- Abschnitte mit der entsprechenden Erkrankung assoziieren lassen.

In unserer Studie wurde der EPOR als Kandidatengen für weitere Untersuchungen ausgewählt. Inwieweit der EPO und der EPOR in die Pathophysiologie des I/R Schadens und der damit verbundenen DGF involviert sind, ist bisher nicht geklärt. Allerdings machen zahlreiche Studien an Tieren einen Einfluss auf den I/ R Schaden und damit folglich auf die DGF möglich. Basierend auf dem Konzept des Ischämie/ Reperfusionsschadens konzentrieren sich die meisten Studien auf mögliche involvierte Gene. In unterschiedlichen Arbeiten konnte eine veränderte Genexpression von Adhäsionsmolekülen und Apoptoseregulierenden Genen nachgewiesen werden. Schwarz et al. beobachteten eine verminderte Expression antiapoptotischer Gene wie Bcl2 und BclxL. Diese war assoziiert mit dem Auftreten einer Delayed Graft Function (Schwarz, Hauser et al. 2002). In einer anderen Studie am Mausmodell konnte nach Induktion eines Ischämie Reperfusionsschadens eine Hochregulation proapoptotischer als auch antiapoptotischer Gene beobachtet werden. Während allerdings proapoptotische Gene wie BAD beständig während der Reperfusionszeit über 24h exprimiert wurden, war der antiapoptotische Faktor Bcl2 nur 3 Stunden nach Beginn der Reperfusion nachweisbar. Weitere während der ersten drei Stunden hochregulierte Gene waren unter anderem der antiapoptotische Faktor NF kB und das zytoprotektive HSP 70. Die ungleiche Genexpression bewirkt insgesamt eine Dysbalance zugunsten der proapoptitischen Faktoren während des Ischämie Reperfusionsschadens (Supavekin, Zhang et al. 2003).

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass EPO über seinen Rezeptor seine intrazelluläre Wirkung über die Veränderung der Expression oben dargestellter Gene vermitteln kann (Digicaylioglu and Lipton 2001; Yang, Li et al. 2003; Liao, Chi et al. 2008).

Weitere Genexpressionstudien belegen eine vermehrte Beteiligung inflammatorischer Zytokine und Chemokine im Rahmen der DGF. Insbesondere die Expression von IL-6 war signifikant assoziiert mit der Entwicklung einer DGF. Eine andere Arbeit beschreibt die vermehrte Expression von IFN- γ , TGF- β 1, PDGF-B, IL-2, IL-6, und IL-10 während des Ischämie/Reperfusionsschadens an Spendernieren (Kaminska, Tyran et al. 2007).

Eine vermehrte Expression des EPOR im ZNS im Rahmen inflammatorischer Prozesse ist beschrieben (Nagai, Nakagawa et al. 2001). In vitro kommt es zu einer verminderten Expression von IL-6 nach Gabe von EPO (Avasarala and Konduru 2005). Zusätzlich kommt es zur Modifikation weiterer proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise TNF α (Villa, Bigini et al. 2003). Ein Einfluss auf die inflammatorischen Prozesse während des Ischämie/Reperfusionsschadens der Niere durch EPO und seinen Rezeptor scheint anhand dieser Überlegungen durchaus möglich.

Hauser et al. zeigten eine vermehrte Expression der α -Untereinheit von HIF nach einer Leichenspende versus einer Lebendspende (Hauser, Schwarz et al. 2004). Dies wiederum könnte zu einer erhöhten Expression von EPO zu führen.

Die dargestellten Aspekte stützen die Überlegung den EPOR in das pathophysiologische Konzept der DGF mit einzubeziehen, und den EPOR als Kandidatengen für unsere Untersuchungen zu wählen.

4.2.3.2 EPOR als Kandidatengen in der Untersuchung eines Sportlerkollektivs

Die gefundenen Polymorphismen an einem Leistungssportlerkollektiv zu untersuchen, gründete auf folgenden Überlegungen. Die Tatsache, dass eine Erhöhung der Menge an Roten Blutkörperchen zu einer Leistungsverbesserung führt ist lange bekannt. Studien belegen eine Verbesserung der maximalen Sauerstoffaufnahme VO₂max nach Gabe von EPO um durchschnittlich 7% (Birkeland, Stray-Gundersen et al. 2000; Russell, Gore et al. 2002). Weiterhin führt Ausdauersport auch zu einer erhöhten EPO- Eigenproduktion (Schwandt, Heyduck et al. 1991; Roecker, Kowoll et al. 2006)

Daneben kann aufgrund von in vitro und in vivo Studien von einer direkten EPO- Wirkung am Skelettmuskel ausgegangen werden. So exprimieren murine Myoblasten den EPO Rezeptor. Zusätzlich führt die Gabe von EPO zu einer vermehrten Proliferation der murinen Satellitenzellen, was eine Rolle bei der Muskelentwicklung möglich macht (Ogilvie, Yu et al. 2000). Der Nachweis des EPOR an humanen Endothel- und Muskelzellen deutet auf eine physiologische Rolle im Rahmen der Angiogenese und Muskelzellen hin (Lundby, Hellsten et al. 2008). Unterstrichen wird die Hypothese einer Rolle von EPOR und EPO im Skelettmuskel durch eine Studie von Rundqvist et al. Diese fanden an gesunden Probanden in Muskelbiopsien, eine EPOR Expression im Sarkolemm und den Kapillaren.

Nach einer erfolgten 65- minütigen Belastung kam es darüber hinaus zu einem Anstieg der Konzentration der EPOR- mRNA. Weiterhin fand sich eine erhöhte JAK- 2 Phosphorylierung als Bindeglied im Rahmen der EPOR Signaltransduktion. Hieraus ergibt sich eine mögliche Rolle des EPOR während belastungsinduzierter Anpassungsvorgänge des Skelettmuskels (Rundqvist, Rullman et al. 2009)

4.3 Diskussion der experimentellen Ergebnisse

Vorbemerkungen

Für alle untersuchten Kollektive wurden Berechnungen nach dem Hardy Weinberg Gleichgewicht vorgenommen. Die beobachteten Genotypfrequenzen zeigten keine Abweichung von den erwarteten Frequenzen, so dass sich alle untersuchten Gruppen im Hardy Weinberg Gleichgewicht befanden.

4.3.1 Exon 2 Nierenspenderkollektiv

In dieser Arbeit wurde mit der Methode der Sequenzierung der EPOR auf Mutationen in einem Nierenspenderkollektiv untersucht. Hierfür wurden zunächst Spender in zwei Gruppen geteilt. Die erste Gruppe setzte sich aus Spendern zusammen, bei deren Transplantation der Nieren es nicht zum Auftreten einer DGF trotz einer kalten Ischämiezeit größer 24 Stunden gekommen war. In dieser Gruppe konnte bei einem Spender eine bisher nicht beschriebene Mutation im Exon 2 detektiert werden. Der an Position 168 liegende Basenaustausch von Guanin zu Adenin führt zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz mit einem Austausch von Glycin zu Glutaminsäure. Es handelt sich somit um einen nichtsynonymen Basenaustausch. Während es sich bei Glycin um eine neutral geladene Aminosäure handelt, ist Glutaminsäure eine saure Aminosäure.

Inwieweit diese unterschiedlichen Eigenschaften der Aminosäuren eine veränderte Struktur und nachfolgend veränderte Funktionalität des gesamten Proteins bewirken, lässt sich derzeit nur vermuten. Die Sequenzvariation wurde kürzlich in die SNP- Datenbank aufgenommen. Die bisher beim Menschen im EPOR- Gen gefundenen Mutationen lagen allesamt im zytoplasmatischen Teil. Hieraus resultierte eine gesteigerte Aktivierung über eine fehlende Hemmung der Transduktionskaskade. Die gefundene Sequenzvariation dagegen liegt im extrazellulären Bereich des EPO Rezeptors. Eine experimentell, induzierte Punktmutation im extrazellulären Teil des Rezeptors in Position 129 mit Austausch von Arginin zu Cystein führt zu einer vermehrten Aktivierung des Rezeptors (Yoshimura, Longmore et al. 1990).

Für eine funktionelle Relevanz auf der Aminosäurenebene spricht die relativ hohe evolutionäre Konservierung der von der Substitution betroffenen Aminosäurenposition (siehe 3.2.1.2) unter den einzelnen Säugetieren.

Betrachtet man die Struktur des EPOR können weitere Überlegungen angestellt werden. Der extrazelluläre Teil des EPOR besteht aus zwei β -Faltblatt Domänen, die als D1 (N-terminal) und D2 (C-terminal) bezeichnet werden. Die beiden Domänen stehen fast senkrecht aufeinander und formen ein umgekehrtes „L“ mit der Ligandenbindungsseite. Neben der vorherrschenden β -Faltblattstruktur findet sich im Aminoterminalen Teil eine α Helix, die ausgeprägte Verbindungen mit den D1 und D2 Domänen eingeht. Die α Helix ist amphipatisch, hat also sowohl hydrophile und hydrophobe Anteile. Mehrere hydrophobe Interaktionen zwischen der α Helix und der D1 Domäne stabilisieren die Struktur. Daneben finden sich zwei Salzbrücken zwischen der α Helix und dem restlichen Protein (Osslund and Syed 2003). Die gefundene Sequenzvariation grenzt direkt an die α Helix. Durch den Austausch von Glycin zu Glutaminsäure kommt es zu einer zusätzlichen negativ geladenen Seitenkette, die weitere Bindungen, insbesondere Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Restmolekül eingehen könnte. Hieraus könnte eine Stabilisierung des Rezeptors resultieren, was wiederum zu einer verstärkten Wirkung von EPO in der Zelle führen könnte.

Die in unserem Kollektiv gefundene Mutation ist insgesamt selten (Prävalenz 0,91%). Bestätigt wird die Annahme einer seltenen und möglicherweise relevanten Mutation durch die Tatsache, dass keine homozygoten Mutationsträger gefunden wurden.

Zwei mögliche Erklärungen für einen Einfluss auf die Rezeptorfunktion einer heterozygoten Mutation seien hier angeführt. Zum ersten wird die Bindung von EPO über das EPOR Dimer zu unterschiedlichen Teilen über die beiden Monomere vermittelt (Philo, Aoki et al. 1996). Somit könnte bereits die strukturelle Veränderung eines Monomers eine Veränderung der Signaltransduktion bewirken.

Die zweite Erklärung bedient sich der Annahme eines zweiten Rezeptorsubtyps mit Bindung eines EPOR- Monomers mit einer β cR Untereinheit. Auch hier könnte bereits durch die Variation eines EPOR- Monomers, Einfluss auf die Signaltransduktion ausgeübt werden. Die zytoprotektiven Effekte von EPO werden in vielen Studien diesem heteromeren Rezeptor zugesprochen (Brines, Grasso et al. 2004)

Bisher unveröffentlichte Studien zum Bindungsverhalten des Rezeptors durch Frau PD. Dr. med. Klingmüller des DKFZ Heidelberg, belegen eine Veränderung der Affinität von EPO gegenüber des die Mutation tragenden Rezeptors. Eine endgültige Aussage kann hier aber

noch nicht getroffen werden. Hierfür bedarf es weiterer Untersuchungen bezüglich der Veränderung der Rezeptorfunktion.

Betrachtet man weiterhin die klinischen Parameter, so erscheint eine funktionelle Relevanz durchaus möglich.

Bemerkenswert ist, dass die durchschnittliche Kreatininclearance vor der Nierentransplantation unter den Mutationsträgern signifikant niedriger war, als unter den Wildtypspendern ($p < 0,05$).

In der Gruppe der Mutationsträger fand sich eine DGF Rate von 33%. Die DGF Rate der Wildtypträger betrug dagegen 38%. Allerdings muss betont werden, dass hier keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Wie in der Einleitung bereits ist der klinische Begriff einer Delayed Graft Function nicht uneingeschränkt verwendbar. So wird die Indikation zur postoperativen Dialyse auch aufgrund unterschiedlicher Regime des jeweiligen Zentrums oder anderer Indikationen gestellt. Somit ist eine alleinige Betrachtung des Parameters DGF nicht ausreichend.

Vergleicht man die Anzahl der benötigten Dialysebehandlungen bis zum Erreichen einer selbständigen Nierenfunktion, so findet sich hier eine Tendenz zu einer vermehrt notwendigen Behandlungen bei den Wildtypen. Allerdings ergab sich hier keine statistische Signifikanz. Ebenfalls nicht signifikant, aber zugunsten der Mutationsträgernieren verändert, war der Kreatininwert am Tag 28, welcher bei den Wildtypspendern mit 2,3mg/dl versus 1,7mg/dl verändert war.

Der in vielen Studien als wichtigster die Nierenfunktion widerspiegelnder Parameter nach erfolgter Transplantation ist die errechnete GFR (eGFR) am Tag 28. Hier fand sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zugunsten der Mutationsträger. Da dieser Marker über die MDRD Formel bestimmt wird, unterliegt er geringeren subjektiven Kriterien als die DGF. Ein weiterer errechneter Wert ist die Delta GFR, die GFR vor der Transplantation mit der GFR einer gespendeten Einzelniere nach Transplantation vergleicht. Hier ergibt sich bei den Mutationsträgern eine signifikant verbesserte Funktion der Einzelniere gegenüber den Wildtypen.

Die erhobenen Parameter sprechen für einen möglichen Einfluss der Exon 2 Mutation auf den klinischen Verlauf nach erfolgter Nierentransplantation. Dabei scheint zwar die DGF- Rate durch die Mutation nicht signifikant beeinflusst zu werden, weitere klinische Parameter sprechen aber für eine schnellere Erholung der Organe von Mutationsträgern. Dies spiegelt sich insbesondere in der erhöhten eGFR der Mutationsträger wieder.

Die Krankenhausverweildauer der Wildtypnierenempfänger war zwar ebenfalls gegenüber den Mutationsträgern verlängert. Hier konnte aber keine statistische Signifikanz erreicht werden.

4.3.2 Ergebnisse der Sportleruntersuchung

Die gefundene Exon 2 Mutation wurde wie oben beschrieben an einem Kollektiv mit Ausdauersportlern verglichen mit einem gesunden Kontrollkollektiv untersucht. Unter den Leistungssportlern trugen 2,84% die Exon 2- Mutation. Im Kontrollkollektiv betrug die Mutationsfrequenz nur 1,25%. Eine statistische Signifikanz wurde hierbei nicht erreicht. Es zeigt sich aber eine erhöhte Frequenz der Exon 2 Mutation im Kollektiv der Leistungssportler. Da aktuell die funktionelle Relevanz der gefundenen Mutation noch nicht einzuordnen ist, kann hier nur spekuliert werden, inwieweit die Mutation einen Einfluss auf die Ausdauerfähigkeit hat. Wie bereits oben beschrieben, kann durch Ausdauersport eine erhöhte Expressierung des EPOR an Muskelzellen nachgewiesen werden. Träger der Mutation könnten durch eine verstärkte EPO Wirkung eine schnellere Regeneration und verbesserte Perfusion des Muskels aufweisen, wodurch es zu einer verbesserten Effizienz der Muskelarbeit käme. Über mögliche die Endothelialisierung und Apoptoseeinfluss beeinflussende Faktoren folgen weitere Überlegungen.

4.3.3 Andere Kollektive

Neben dem genannten Nierenspenderkollektiv wurde ein Kontrollkollektiv auf die gefundenen Mutationen untersucht. Hier zeigte sich eine Prävalenz von 2% der Exon 2- Mutation unter den Kontrollpersonen. Dies bestätigt die Annahme einer seltenen Sequenzvariation, was wiederum für eine funktionelle Relevanz sprechen könnte.

Das Kontrollkollektiv setzte sich dabei aus Personen zusammen, die zuvor aufgrund unterschiedlicher Fragestellungen einer genetischen Analyse unterzogen worden waren. Somit konnte nachvollzogen werden, welche vermutete Grunderkrankung zur Diagnostik geführt hatte. Zwei der gefundenen Mutationsträger waren ursprünglich auf eine familiäre Thrombophilie untersucht worden. Zu den häufigeren, bekannten Nebenwirkungen einer EPO Therapie gehört das Auftreten von Thrombosen.

Eine die EPO Wirkung verstärkende Mutation könnte daher auch die Entwicklung von Thrombosen begünstigen. In weiteren 60 untersuchten Personen, mit einer ungeklärten Thrombophilie konnte kein weiterer Mutationsträger detektiert werden. Eine Assoziation kann angesichts der geringen Zahl untersuchter Personen weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Hierfür wäre eine Untersuchung eines größeren Kollektivs vonnöten.

4.3.4 Mutation Exon 4

Mit Hilfe der Sequenzierung konnten bei zwei Spendern eine heterozygote Mutation im Exon 4 nachgewiesen werden. Diese bedingt einen nicht synonymen Austausch von Histidin zu Arginin. Während es sich bei Histidin um eine aromatische Aminosäure handelt, ist Arginin eine aliphatische Aminosäure. Beide tragen eine positiv geladene Seitenkette. Dies führt zu ihrem basischen Verhalten. Die Sequenzvariation wurde nur bei zwei Spendern gefunden. Weder im untersuchten Kontrollkollektiv, noch im Kollektiv der Sportler fanden sich weitere Träger. Dies spricht für das Vorliegen einer seltenen Mutation und gegen einen Polymorphismus. Für eine funktionelle Rolle der gefundenen Variation spricht die hohe evolutionäre Konservierung der Aminosäure unter den verschiedenen Säugetierspezies (vgl. 3.2.2). Betrachtet man das Modell des Rezeptors in Abschnitt 3.2.2.4, so erkennt man die aromatische Seitenkette von Histidin. Durch einen Austausch durch Arginin käme es zu einem Wegfall dieser Seitenkette. Dies wiederum könnte zu einer Veränderung der intrastrukturellen Bindungen mit möglicher Destabilisierung des Rezeptorligandenkomplexes führen.

Inwieweit dies Einfluss auf die Sekundärstruktur des EPOR hat, kann aber aktuell noch nicht eingeordnet werden.

Klinische Parameter

Betrachtet man die klinischen Parameter der beiden Spender ergeben sich folgende Aspekte.

Bei drei der vier Nieren lag die kalte Ischämiezeit dabei unter 12 Stunden. Eine Niere zeigte eine CIT von 36 Std. In zwei der 4 Nieren kam es trotz niedriger CIT zur Entwicklung einer DGF. Die Niere mit der langen Ischämiezeit zeigte ebenfalls eine DGF. Bei der vierten Niere kam es zur Entwicklung einer akuten Abstoßung.

Die gefundene Mutation war nur bei zwei Spendern nachweisbar. Insgesamt ist diese also sehr selten. Homozygote Träger wurden nicht gefunden. Da die Transplantation der Nieren der Mutationsträger in 3 von 4 Nieren eine DGF zeigte, könnte eine Assoziation durchaus

bestehen. Allerdings waren bei beiden Spendern weitere Faktoren vorhanden, die einen negativen Einfluss auf das Transplantatoutcome wahrscheinlich machen. So lagen beide Spender über dem Durchschnittsalter des Kollektivs. Aufgrund von Studien kann davon ausgegangen werden, dass sich das Risiko für eine DGF ab einem Alter von 55 Jahren verdoppelt (Halloran and Hunsicker 2001). Beide Spender waren über 55 Jahre alt. Bei Niere 2 von Spender 1 lag zusätzlich eine deutlich erhöhte CIT von 36 Stunden vor, welche damit weit über dem Durchschnittswert von 12,4 Stunden. Daneben bestand bei Spender 2 ein erhöhtes HLA Mismatch.

Aufgrund der klinischen Parameter ist eine DGF Entwicklung unabhängig von der bei drei Nieren sehr kurzen CIT durchaus möglich. Ob die gefundene Sequenzvariation zusätzlich einen Einfluss auf das Outcome der Nieren hat, kann aktuell weder bestätigt, noch ausgeschlossen werden. Hierfür wären weitere Untersuchungen der Rezeptorfunktion nach Induktion der Mutation vonnöten, die nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind.

4.4 Einbindung der gefundenen Mutationen in die Pathophysiologie der DGF

Die Delayed Graft Function ist ein klinischer Begriff. Ihr liegen pathophysiologische Zusammenhänge im Rahmen des Ischämie Reperfusionsschadens zugrunde. Da aktuell die funktionelle Relevanz der beiden gefundenen Mutationen nicht geklärt ist, sind die folgenden Überlegungen hypothetischer Natur. Es soll dargestellt werden, welche potentiellen Einflüsse ein veränderter Rezeptor auf die pathophysiologischen Abläufe haben könnte.

Das angeschlossene Diagramm fasst die Wirkungen von Erythropoietin zusammen, auf die im Weiteren noch einmal näher eingegangen wird.

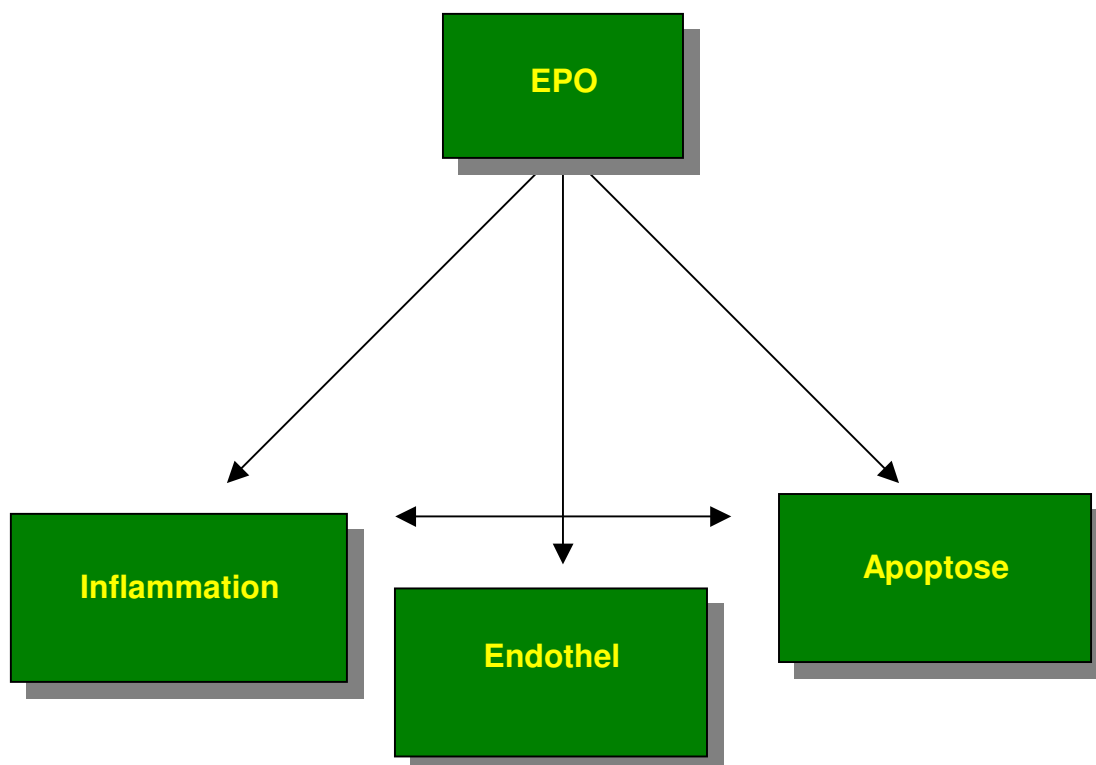


Abbildung 14: Zusammenfassung der potentiellen Wirkungen von Erythropoietin

4.4.1 Inflammation

Während des Ischämie- Reperfusionsschadens der Niere, kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems im ischämischen Nierengewebe. Die inflammatorischen Prozesse nehmen ihren Anfang während der Ischämiephase, und verstärken sich während der Reperusionsphase. Dabei kommt es zur Aktivierung des Endothels, zum Einwandern von Leukozyten, einer vermehrten Bildung von Chemokinen und Zytokinen, sowie einer Aktivierung des Komplementsystems (Jang, Ko et al. 2009). Eine Blockierung der inflammatorischen Prozesse hingegen führt zu einer Verbesserung der Nierenfunktion, was den Stellenwert der Inflammation unterstreicht (Bonventre and Zuk 2004).

Durch den Ischämie Reperfusionsschaden wird die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF α gesteigert (Donnahoo, Meng et al. 1999). Daneben findet sich eine erhöhte Konzentration von IL-18 gegenüber unmittelbar funktionierenden Nieren (Parikh, Jani et al. 2004).

Über die Endothelzellen und Epithelzellen kommt es zu einer erhöhten Ausschüttung von Chemokinen für Lymphozyten wie RANTES, Monozyten wie MCP-1 und IL-8 für Neutrophile Granulozyten. Des Weiteren finden sich in Nieren von Totspendern erhöhte Konzentrationen der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und P Selektin (Snoeijs, van Heurn et al.). Dies führt zu einem verstärkten Einstrom neutrophiler Granulozyten, welche letztlich über eine Bildung von Radikalen oder Zytokine zu einer Zellschädigung führen können (Kosieradzki and Rowinski 2008).

Inflammatorische Prozesse spielen somit eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung des Ischämie Reperusionschadens.

Eine potentielle protektive Rolle für EPO im Rahmen der inflammatorischen Prozesse kann angenommen werden. Strunk et al. zeigten an humanen Leukozyten eine reduzierte Produktion der Zytokine IL-2, IL-6, -8, IFN γ und TNF α nach Stimulation mit Lipopolysaccharid und anschließender rhEPO Gabe (Strunk, Hartel et al. 2008).

Wie im Einleitungsteil beschrieben, kann die Gabe von Erythropoietin im ZNS eine Reduktion der IL-6, TNF α und MCP-1 Konzentration bewirken (Villa, Bigini et al. 2003).

Die Annahme einer protektiven Wirkung wird durch andere Studien unterstützt. Viele unterschiedliche Zellen zeigen unter Stressbedingungen eine erhöhte EPO Produktion,

insbesondere die Endothelzellen der Kapillaren. Allerdings wird die intrinsische EPO Produktion durch proinflammatorische Zytokine unterdrückt, so dass letztlich der inflammatorische Stimulus zunächst überwiegt. Dies führt zu einer Verlagerung der EPO Produktion in die Peripherie der entzündlichen Läsionen, in der die Konzentration proinflammatorischer Zytokine geringer ist (Bernaudin, Marti et al. 1999). Des Weiteren inhibiert EPO aber wiederum die Produktion inflammatorischer Marker, insbesondere von TNF α , so dass es zur Einstellung eines Gleichgewichts zwischen den sich gegenseitig regulierenden Faktoren kommt (Agnello, Bigini et al. 2002). Dieses bestimmt letztlich die Größe der entzündlichen Läsion. Während die EPO Produktion vornehmlich in der Peripherie stattfindet, kommt es im Zentrum zu einer verstärkten Expression des EPOR unter proinflammatorischen Einflüssen (Nagai, Nakagawa et al. 2001). Somit können insbesondere Zellen, welche den EPOR exprimieren, unter einem EPO Einfluss vor dem Zelltod bewahrt werden (Brines 2010).

Aus diesen Überlegungen kann gemutmaßt werden, dass der Einfluss proinflammatorischer Zytokine während der Ischämie/ Reperfusionsschädigung durch eine verstärkte EPO Wirkung reduziert wird. Eine verstärkte Wirkung durch einen veränderten und in seiner Transduktion verstärkten Rezeptor könnte weiterhin zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung einer geringeren inflammatorischen Reaktion führen.

Betont werden muss, dass die angeführten Überlegungen hauptsächlich auf Beobachtungen im ZNS, basieren. Somit ist eine Übertragung auf die Abläufe im Rahmen des Ischämie/ Reperfusionsschadens nicht ohne weiteres möglich.

4.4.2 Einfluss auf das Endothel

Während des Ischämie Reperfusionsschadens kommt es neben einer Schädigung der Tubuluszellen auch zu einer Veränderung der Endothelzellaktivität. Dies führt zu einer vermehrten Produktion von Adhäsionsmolekülen wie ICAM 1, E-, P- Selektinen, welche die Einwanderung inflammatorischer Zellen, insbesondere neutrophiler Granulozyten begünstigen. Zudem kommt es zu einer Veränderung des Gefäßtonus. Im geschädigten Endothel kommt es zu einem Ungleichgewicht von vasokonstriktorisches Eikosanoiden, insbesondere Thromboxan A₂, gegenüber vasodilatierenden Prostacyclinen (Finn, Hak et al. 1987). Resultierend aus den dargestellten Veränderungen ist eine Veränderung der Mikrozirkulation bei Patienten mit einer Delayed Graft Function (Angelescu, Kraus et al. 2003).

Ein im Bereich des Endothels wirkender Metabolit ist Nitritoxid (NO). Bereits in der Einleitung wurde auf die zwiespältige Rolle von NO während des Ischämie Reperfusionsschadens hingewiesen. So führt NO zum einen zu einer Vasodilatation des postischämisch zu Gunsten der Vasokonstriktion veränderten Gefäßtonus, was eine verbesserte Oxygenierung bedingt. Daneben führt es auch zu einer verminderten Expression von Adhäsionsmolekülen, so dass die Einwanderung proinflammatorischer Zellen gebremst wird.

Neben den potentiell protektiven Wirkungen von NO, kann es durch dieses auch zu einer Schädigung von Zellen kommen. Der für diese Zelltoxizität verantwortliche NO- Metabolit Peroxynitrit inhibiert die Zellatmung und die DNA- Synthese. Daneben kann eine durch Vasodilatation entstandene Strömungsverlangsamung zu einer überschießenden Thrombenbildung führen und damit die Zirkulationsstörung weiter begünstigen (Sheridan and Bonventre 2000).

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, exprimieren Endothelzellen den EPOR (Anagnostou, Liu et al. 1994). In unterschiedlichen Studien konnte eine direkte Wirkung von EPO auf das Endothel beobachtet werden. So kommt es zu einem Schutz gegenüber Ischämieschäden, einer Verminderung der Apoptose, Regulierung der Zell-Zell und Zell-Matrix Verbindungen, sowie einer vermehrten Einwanderung von Endothelzellen (Anagnostou, Lee et al. 1990; Carlini, Reyes et al. 1995; Ribatti, Presta et al. 1999; Chong, Kang et al. 2002). Ein wichtiger Mechanismus für die Wirkung am Endothel von EPO ist die Aktivierung der endothelialen Nitrid Oxid Synthase (eNOS). Diese führt wiederum zur vermehrten Bildung von Nitrid Oxid. Inwieweit im Rahmen des Ischämie Reperfusionsschadens eine Veränderung oder gar Schädigung durch EPO aufgrund der NO Bildung stattfindet ist bisher unzureichend geklärt. Eine verstärkte Bildung von Superoxidanionen durch die durch EPO induzierte eNOS unter Bedingungen des Substratmangels, oder unter hypoxischen Bedingungen ist beschrieben (Mihov, Vogel et al. 2009).

Eine weiterer Aspekt der EPO- Wirkung ist der stimulierende Einfluss auf endotheliale Progenitor Zellen (EPCs) aus dem Knochenmark. Diese beeinflussen die endotheliale Regeneration und vaskuläre Reparaturprozesse. EPO übt hierbei einen regulatorische Funktion auf die Proliferation und Differenzierung der EPCs aus (Bahlmann, De Groot et al. 2004).

Durch einen in seiner Funktion veränderten Rezeptors wären auch Veränderungen im Endothel denkbar. So könnte es durch eine gesteigerte EPO Wirkung zur Stimulation der Endothelzellen kommen, was eine Verbesserung der Perfusion zur Folge haben könnte. Eine eingeschränkte Rezeptorfunktion hätte möglicherweise dagegen den umgekehrten Effekt.

4.4.3 Apoptose

Die Apoptose ist eine physiologische und exakt gesteuerte Form des Zelluntergangs. Sie wird entweder durch Rezeptoren an der Zelloberfläche oder durch den Verlust der mitochondrialen Struktur initiiert. Dabei unterscheidet sich die Apoptose von der Nekrose durch morphologische und funktionelle Merkmale, als auch durch den Energiebedarf (Sanz, Santamaria et al. 2008). Im Rahmen des akuten Nierenversagens als auch bei Nierentransplantaten werden insbesondere Tubulusepithelzellen und Endothelzellen während der frühen Reperfusionsphase dem Prozess der Apoptose unterzogen (Burns, Davies et al. 1998). Dabei enthalten Nieren mit einer frühen Transplantatdysfunktion wesentlich mehr apoptotische Zellen, als Nierentransplantate mit einer sofortigen Transplantatfunktion. Ursächlich zeigt sich dabei eine vermehrte Bildung proapoptotischer Proteine wie Bax und Bad. Hingegen wird die Bildung antiapoptotischer Proteine wie Bcl2 und Bcl xL, sowie die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrien in das Zytoplasma der Tubuluszellen gebremst (Matsuno, Sasaki et al. 1996; Schwarz, Hauser et al. 2002; Castaneda, Swiatecka-Urban et al. 2003). Während eine kleine Anzahl apoptotischer Zellen durch Makrophagen abgeräumt werden kann, ohne einen inflammatorischen Prozess in Gang zu setzen, führen ein nekrotischer Zelluntergang oder ein unkontrolliertes Auftreten apoptotischer Zellen zu einer Aktivierung des Immunsystems (Snøeijds, van Heurn et al.).

Wie bereits oben angeschnitten, gibt es zwei Möglichkeiten die Apoptose zu initiieren. Der extrinsische Pfad wird über Todesrezeptoren (Death Receptors) initiiert. Über sie kommt es zum Zusammenschluss von Multimolekülkomplexen, zu denen Proteine wie FADD, und die Aktivator Caspasen 8 und 10 gehören (Ashkenazi and Dixit 1999). Hierdurch kommt es zur Substratspaltung mit anschließender Aktivierung von nachgeschalteten Effektor Caspasen,

Der intrinsische Pfad wird über intrazelluläre Organellen insbesondere die Mitochondrien gesteuert (Green and Kroemer 2004). Die Aktivierung des BH3only Proteins führt zur allosterischen Aktivierung von Bax und Bak, welche an der Mitochondrienmembran oligomerisieren. Dies führt zu einer Permeabilitätssteigerung der äußeren mitochondrialen Membran und zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom C, SMAC/ DIABLO und dem apoptosis-inducing factor (AIF), welche caspase abhängig oder unabhängig die Apoptose fördern.

Dabei erleichtern Cytochrome C die Oligomerisation von Apaf-1 und der Caspase 9 im Apoptosom, was letztlich zu einer Aktivierung von Caspase 9 führt. Caspase 9 aktiviert

schließlich Effektorcaspasen –3 und –7, was zur Proteolyse und zum Zelltod führen kann. Zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Signalweg existieren Kurzschlussverbindungen. So kann das proapoptotische BH3-only protein Bid durch die Caspase 8 gespalten und so aktiviert werden. Das entstehende tBid verlagert sich anschließend ins Mitochondrium, um den intrinsischen Arm zu aktivieren.

Auch antiapoptotische Signale sind mit den proapoptotischen Proteinen verschaltet. So führen Bcl 2 verwandte Proteine wie Bcl2 und BclxL zu einer Bindung der Aktivator Proteine BH3-only Protein, Bax und Bak und können auf diese Weise die über Apaf-1 vermittelte Aktivierung der Caspase 9 unterdrücken. Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAP) können weiterhin direkt Caspasen inaktivieren, und werden wiederum durch SMAC/ DIABLO unterdrückt (Sanz, Santamaria et al. 2008).

Neben der beschriebenen proapoptotischen Kaskade kommt es in der Zelle zu Signalen, die die Apoptose unterdrücken. Mehrere Cytokine und Wachstumsfaktoren sind beschrieben, die für die Tubuluszellen und Podozyten als Überlebensfaktoren dienen. Allen gemeinsam ist eine Signalübertragung mit Aktivierung der Phosphatidylinositol 3- Kinase, die wiederum AKT phosphoryliert und aktiviert. Beschrieben sind diese Mechanismen für den Hepatocyte Growth Factor, VEGF (vascular endothelial growth factor), IGF-1, EGF und auch Erythropoietin (Alvarez Arroyo, Suzuki et al. 2002; Kiley, Thornhill et al. 2003; Sharples, Patel et al. 2004; Bridgewater, Ho et al. 2005; Logar, Brinkkoetter et al. 2007).

AKT kann über eine Phosphorylierung den proapoptotischen Faktor Bad inaktivieren. Ist Bad dagegen dephosphoryliert, kann dieser BclxL binden, was zu einem Überwiegen proapoptotischer Faktoren führt. Die Dephosphorylierung von Bad kann in apoptotischen Tubuluszellen nachgewiesen werden (Kiley, Thornhill et al. 2003).

Weiterhin führt Akt zu einer reduzierten Translokation von proapoptotischen Forkhead Proteinen in den Nukleus und begünstigt die Bildung der antiapoptotischen Faktoren NFkB und mdm2, einem Antagonisten von p53 (Amaravadi and Thompson 2005). Daneben finden sich auch erhöhte Konzentrationen für BclxL und Bcl 2 gegenüber proapoptitischen Faktoren wie Bax und dem Fas Rezeptor (Ortiz, Lorz et al. 2000).

Insgesamt kommt es dadurch zur Bildung eines Milieus, welches das Überleben angegriffener Tubuluszellen begünstigt. Entscheidend hierfür ist die Bindung eines intrinsischen oder extrinsisch zugeführten Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor, zum Beispiel Erythropoietin. Der Hemmung der Apoptose wird als Hauptmechanismus für die gewebeprotectiven Eigenschaften von EPO angesehen. In unseren Untersuchungen wurde der Rezeptor für Erythropoietin auf genetische Mutationen untersucht. Die gefundene Mutation in Exon 2 könnte

unter Berücksichtigung der klinischen Daten eine mögliche protektive Rolle einnehmen. Als Mechanismus kommt dabei eine gesteigerte Sensitivität des Rezeptors gegenüber seinem Effektor Erythropoietin in Betracht.

Dies wiederum hätte ein Überwiegen antiapoptotischer Faktoren zur Folge, was letztlich eine erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit der Zellen bedeuten könnte.

Im Detail sei weiterhin auf die Initiierung der Apoptose durch $\text{TNF } \alpha$ hingewiesen. $\text{TNF } \alpha$ kann über Death Domain Rezeptoren den extrinsischen Apoptosepfad initiieren. Dabei kommt es in den Tubulusepithelzellen zu einer vermehrten Bildung der oben erwähnten Faktoren Fas, Bax und Smac/DIABLO, während die Konzentration von BclxL sinkt (Ortiz, Lorz et al. 2000). Über die oben beschriebene Kaskade kommt es zur Initiierung der Apoptose.

Eine verstärkte Inhibierung der $\text{TNF } \alpha$ Produktion, wie für EPO beschrieben oder über eine gesteigerte Rezeptortransduktion, würde somit die Aktivierung des extrinsischen Apoptosepfads unterdrücken.

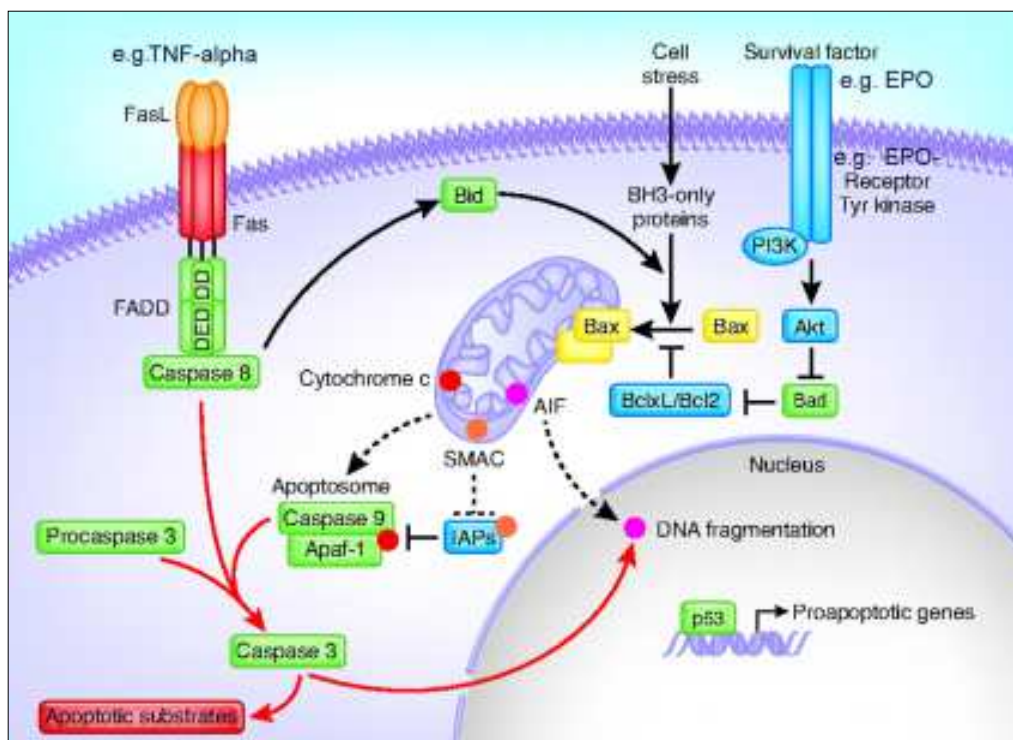


Abbildung 15: (Sanz, Santamaria et al. 2008)

4.4.4 HIF

Ein weiterer Mechanismus für eine Nephroprotektion von EPO durch seinen Rezeptor sei hier aufgezeigt. Wie bereits in der Einleitung beschrieben ist der initiale Stimulus für die EPO und EPOR Expression die Hypoxie mit Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF. In Biopsien von Nieren, die nach der Transplantation noch ungenügende Mengen an Urin bilden, also eine eingeschränkte Funktion zeigen, findet sich eine reduzierte Konzentration des Hypoxia inducible Factor 1 α (HIF 1- α) und seiner Zielgene Hämoxxygenase 1 und VEGF, gegenüber unmittelbar funktionsfähigen Nieren (Lemos, Ijzermans et al. 2003; Rosenberger, Pratschke et al. 2007). Imamura et al konnten in humanen Endothelzellen als auch an der Rattenniere eine vermehrte Expression von HIF α nach EPO Gabe zeigen. Verbunden war die vermehrte HIF α Produktion mit einer Induktion der VEGF mRNA Expression, was wiederum zu einer vermehrten Angiogenese führt (Imamura, Moriyama et al. 2007). Zudem führt VEGF selbst zur Bildung antiapoptotischer Faktoren (Alvarez Arroyo, Suzuki et al. 2002).

HIF α unterdrückt weiterhin das Einwandern von Makrophagen in postischämische Nieren von Ratten, und führt hierdurch zu einer geringeren inflammatorischen Antwort, und somit einer Protektion während der Postischämiephase (Rosenberger, Griethe et al. 2003). Berhardt et al zeigten, dass nach Gabe eines PHD-Inhibitors (FG- 4497) eines Inhibitors des HIF α Abbaus, eine vermehrte Aktivierung protektiver Gene, darunter EPO resultierte (Bernhardt, Gottmann et al. 2009). Berücksichtigt man die oben gemachte Beobachtung einer zusätzlichen Aktivierung von HIF durch EPO, käme es somit zu einer gegenseitigen Regulierung mit Aktivierung. Interessant an dieser Überlegung ist die Möglichkeit einer zusätzlichen indirekten Beeinflussung anderer Gene durch EPO aufgrund einer vermehrten Aktivierung von HIF.

4.5 Klinische Aspekte

Erythropoietin wird aktuell zur Behandlung der renalen Anämie, zur Behandlung chemotherapieinduzierter Anämien, sowie chronisch inflammatorischer Erkrankungen wie AIDS eingesetzt.

Die potentiell protektiven Eigenschaften und seine Mechanismen wurden in dieser Arbeit bereits ausführlich dargestellt.

Allerdings bleibt bisher unklar, inwieweit sich die in vitro und in vivo Studien auch auf den Menschen übertragen lassen. Mohiuddin konnte in einer Studie keinen wesentlichen Effekt einer perioperativen EPO Therapie auf die DGF Rate nachweisen (Mohiuddin, El-Asir et al. 2007). In einer neueren Studie an Nierentransplantierten durch Martinez et al., die den Einsatz von Erythropoietin versus Placebo untersuchte, konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bezüglich des Auftretens einer Delayed Graft Function gefunden werden. Ebenso wenig fand sich eine Veränderung der eGFR oder der bioptisch gesicherten akuten Abstoßungsreaktion. Eine spekulative Theorie für die fehlende Effektivität der EPO Gabe, sehen die Autoren in einem durch den ischämischen Schaden bedingtem Abbau von EPOR tragenden Tubuluszellen, so dass EPO nicht ausreichend an seinen Rezeptor binden kann (Martinez, Kamar et al. 2010).

Der Einsatz von EPO wird auch aufgrund seiner potentiellen Nebenwirkungen beschränkt. Insbesondere die für die gewebeprotektiven Eigenschaften benötigten höheren Dosen, könnten zu einer Zunahme von Komplikationen führen. Anzusprechen ist hier das erhöhte Risiko für Thrombosen. Unter Patienten, die eine erhöhte Aktivität proinflammatorischer Zytokine, im Rahmen von Traumen, Infektionen oder malignen Erkrankungen, aufweisen, scheint das Risiko für Thrombosen unter einer EPO Therapie deutlich erhöht (Corwin, Gettinger et al. 2007; Bennett, Silver et al. 2008). In der oben dargestellten Studie von Martinez et al. fand sich kein erhöhtes Thromboserisiko während der erfolgten EPO Therapie (Martinez, Kamar et al. 2010).

Eine weitere aktuelle klinische Studie mit Einsatz von hochdosiertem EPO bei Patienten mit einem akuten ST -Hebungsinfarkt erbrachte keine Verbesserung der linksventrikulären Funktion nach 6 Wochen. Die Patienten erhielten dabei einmalig EPO 3 Stunden nach erfolgter perkutaner Koronarintervention. Der primäre Endpunkt einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion wurde dabei nicht erreicht. Allerdings kam es zu einem geringeren Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse wie einer frühen Stentthrombose oder eines Herzversagens. Zusätzlich traten unter der hochdosierten EPO Therapie keine wesentlichen

Nebenwirkungen auf, was auf eine hohe Sicherheit der einmaligen Injektion schließen lässt (Voors, Belonje et al.).

Aktuell ist der Nutzen einer zusätzlichen EPO- Therapie im Rahmen des Ischämie/ Reperfusionsschäden am Menschen unklar.

Die gefundenen EPOR Sequenzvariationen könnten einen Einfluss auf die klinische Wirksamkeit einer EPO Therapie im Rahmen eines I/R ausüben. Geht man bei den Trägern der gefundenen Exon 2 Variation von einer verstärkten Sensibilität gegenüber einer EPO Therapie aus, so könnten Mutationsträger möglicherweise besonders von einer EPO- Gabe profitieren. Weiterhin könnte bei Exon 2 Mutationsträgern eine geringere EPO Dosis bereits eine protektive Funktion ausüben, was potentielle Nebenwirkungen einer hochdosierten EPO Therapie reduzieren könnte. Nimmt man dagegen bei Trägern der Exon 4 Mutation einen negativen Einfluss auf die Signaltransduktion an, so wäre hier möglicherweise eine höher dosierte EPO Gabe vonnöten um einen Therapieerfolg erzielen zu können.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund pathophysiologischer Überlegungen das Gen des Erythropoietinrezeptors (EPOR) als Kandidatengen für genetische Untersuchungen in einem Kollektiv von Nierenspendern gewählt. Dabei sollte die Frage einer genetischen Prädisposition bezüglich des Auftretens einer Delayed Graft Function (DGF) untersucht werden. In der Sequenzierung des EPOR Gens der Spender fanden sich zwei bisher nicht beschriebene, heterozygote Mutationen im extrazellulären Bereich des EPOR. Die erste Mutation befindet sich im Exon 2 und führt zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Glutaminsäure. Mit Hilfe des Restriktionsverdaus konnten insgesamt 8 Spender mit der vorliegenden Mutation detektiert werden. Analysiert man den Genotyp und das Outcome der, die Mutation tragenden Spender fand sich eine erniedrigte, aber nicht signifikante Rate von DGFs (33% vs. 38%). Zusätzlich zeigte sich eine verbesserte Nierenfunktion am Tag 28 ausgedrückt durch eine verbesserte GFR, als auch ein erniedrigter Kreatininwert. Signifikanz wurde dabei nur bei der eGFR erreicht.

Zur weiteren Einordnung der gefundenen Mutation wurden weitere Kollektive mit Hilfe des Restriktionsverdaus analysiert. In einem Kollektiv aus Hochleistungssportlern ergab sich dabei eine nichtsignifikante Zunahme der Prävalenz gegenüber den anderen analysierten Gruppen, was einen möglichen Vorteil von Mutationsträgern im Vergleich zu Wildtypen im Rahmen von Ausdauersport möglich macht.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann eine mögliche protektive Funktion der gefundenen Mutation angenommen, aber nicht bewiesen werden. Hierzu bedarf es weiterer Analysen der Rezeptorfunktion.

Neben der oben genannten Mutation wurde mit Hilfe der Sequenzierung eine weitere Punktmutation im Exon 4 des EPOR Gens gefunden. Diese führt zu einem Aminosäureaustausch in Position 161 von Histidin zu Arginin. Auch diese gefundene Mutation wurde mit Hilfe eines Restriktionsverdaus im Nierenspenderkollektiv untersucht. Dabei fanden sich insgesamt nur zwei Merkmalsträger. Auch in den untersuchten Kontrollkollektiven konnten keine weiteren Merkmalsträger detektiert werden, so dass diese Mutation insgesamt selten ist. Da das Outcome der vier transplantierten Nieren insgesamt schlechter war, als das der Wildtypspender, kann ein negativer Einfluss auf den Transplantatverlauf durch diese Mutation postuliert, aber letztlich nicht bewiesen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abdelrahman, M., E. J. Sharples, et al. (2004). "Erythropoietin attenuates the tissue injury associated with hemorrhagic shock and myocardial ischemia." Shock **22**(1): 63-9.
- Agnello, D., P. Bigini, et al. (2002). "Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalitis." Brain Res **952**(1): 128-34.
- Almond, P. S., C. Troppmann, et al. (1991). "Economic impact of delayed graft function." Transplant Proc **23**(1 Pt 2): 1304.
- Alvarez Arroyo, M. V., Y. Suzuki, et al. (2002). "Role of endogenous vascular endothelial growth factor in tubular cell protection against acute cyclosporine toxicity." Transplantation **74**(11): 1618-24.
- Amaravadi, R. and C. B. Thompson (2005). "The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets." J Clin Invest **115**(10): 2618-24.
- Ambros, J. T., I. Herrero-Fresneda, et al. (2007). "Ischemic preconditioning in solid organ transplantation: from experimental to clinics." Transpl Int **20**(3): 219-29.
- Anagnostou, A., E. S. Lee, et al. (1990). "Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15): 5978-82.
- Anagnostou, A., Z. Liu, et al. (1994). "Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3974-8.
- Angelescu, M., T. Kraus, et al. (2003). "Assessment of renal graft function by perioperative monitoring of cortical microcirculation in kidney transplantation." Transplantation **75**(8): 1190-6.
- Arcasoy, M. O., A. F. Karayal, et al. (2002). "A novel mutation in the erythropoietin receptor gene is associated with familial erythrocytosis." Blood **99**(8): 3066-9.
- Arias, M. (2003). "Impact of the delayed graft function in hypersensitized kidney transplant patients." Transplant Proc **35**(5): 1655-7.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1999). "Apoptosis control by death and decoy receptors." Curr Opin Cell Biol **11**(2): 255-60.
- Avasarala, J. R. and S. S. Konduru (2005). "Recombinant erythropoietin down-regulates IL-6 and CXCR4 genes in TNF-alpha-treated primary cultures of human microvascular endothelial cells: implications for multiple sclerosis." J Mol Neurosci **25**(2): 183-9.
- Bahlmann, F. H., K. De Groot, et al. (2004). "Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells." Blood **103**(3): 921-6.

-
- Banks, W. A., N. L. Jumbe, et al. (2004). "Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa." Eur J Pharmacol **505**(1-3): 93-101.
- Bazan, J. F. (1989). "A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain." Biochem Biophys Res Commun **164**(2): 788-95.
- Ben-Ari, Z., E. Hochhauser, et al. (2002). "Role of anti-tumor necrosis factor-alpha in ischemia/reperfusion injury in isolated rat liver in a blood-free environment." Transplantation **73**(12): 1875-80.
- Bennett, C. L., S. M. Silver, et al. (2008). "Venous thromboembolism and mortality associated with recombinant erythropoietin and darbepoetin administration for the treatment of cancer-associated anemia." Jama **299**(8): 914-24.
- Bernaudin, M., H. H. Marti, et al. (1999). "A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice." J Cereb Blood Flow Metab **19**(6): 643-51.
- Bernhardt, W. M., U. Gottmann, et al. (2009). "Donor treatment with a PHD-inhibitor activating HIFs prevents graft injury and prolongs survival in an allogenic kidney transplant model." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(50): 21276-81.
- Birkeland, K. I., J. Stray-Gundersen, et al. (2000). "Effect of rhEPO administration on serum levels of sTfR and cycling performance." Med Sci Sports Exerc **32**(7): 1238-43.
- Bohlius, J., J. Wilson, et al. (2006). "Recombinant human erythropoietins and cancer patients: updated meta-analysis of 57 studies including 9353 patients." J Natl Cancer Inst **98**(10): 708-14.
- Bonventre, J. V. and R. B. Colvin (1996). "Adhesion molecules in renal disease." Curr Opin Nephrol Hypertens **5**(3): 254-61.
- Bonventre, J. V. and A. Zuk (2004). "Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease?" Kidney Int **66**(2): 480-5.
- Boom, H., M. J. Mallat, et al. (2004). "Calcium levels as a risk factor for delayed graft function." Transplantation **77**(6): 868-73.
- Bouchard, C., M. R. Boulay, et al. (1988). "Heredity and trainability of aerobic and anaerobic performances. An update." Sports Med **5**(2): 69-73.
- Bouchard, C., E. W. Daw, et al. (1998). "Familial resemblance for VO₂max in the sedentary state: the HERITAGE family study." Med Sci Sports Exerc **30**(2): 252-8.
- Bouchard, C., F. T. Dionne, et al. (1992). "Genetics of aerobic and anaerobic performances." Exerc Sport Sci Rev **20**: 27-58.
- Bridgewater, D. J., J. Ho, et al. (2005). "Insulin-like growth factors inhibit podocyte apoptosis through the PI3 kinase pathway." Kidney Int **67**(4): 1308-14.

-
- Brines, M. (2010). "The therapeutic potential of erythropoiesis-stimulating agents for tissue protection: a tale of two receptors." Blood Purif **29**(2): 86-92.
- Brines, M. and A. Cerami (2008). "Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response." J Intern Med **264**(5): 405-32.
- Brines, M., G. Grasso, et al. (2004). "Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(41): 14907-12.
- Brines, M. L., P. Ghezzi, et al. (2000). "Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(19): 10526-31.
- Brook, N. R., J. R. Waller, et al. (2003). "Nonheart-beating kidney donation: current practice and future developments." Kidney Int **63**(4): 1516-29.
- Bunn, H. F., J. Gu, et al. (1998). "Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation." J Exp Biol **201**(Pt 8): 1197-201.
- Burns, A. T., D. R. Davies, et al. (1998). "Apoptosis in ischemia/reperfusion injury of human renal allografts." Transplantation **66**(7): 872-6.
- Byts, N. and A. L. Siren (2009). "Erythropoietin: a multimodal neuroprotective agent." Exp Transl Stroke Med **1**: 4.
- Calvillo, L., R. Latini, et al. (2003). "Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4802-6.
- Carlini, R. G., A. A. Reyes, et al. (1995). "Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis in vitro." Kidney Int **47**(3): 740-5.
- Castaneda, M. P., A. Swiatecka-Urban, et al. (2003). "Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemiareperfusion injury." Transplantation **76**(1): 50-4.
- Chatterjee, P. K. (2005). "Pleiotropic renal actions of erythropoietin." Lancet **365**(9474): 1890-2.
- Chen, Z. Y., P. Asavaritikrai, et al. (2007). "Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation." J Biol Chem **282**(35): 25875-83.
- Chong, Z. Z., J. Q. Kang, et al. (2002). "Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases." Circulation **106**(23): 2973-9.
- Chong, Z. Z., J. Q. Kang, et al. (2002). "Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades." J Cereb Blood Flow Metab **22**(5): 503-14.

-
- Chong, Z. Z., J. Q. Kang, et al. (2003). "Apaf-1, Bcl-xL, cytochrome c, and caspase-9 form the critical elements for cerebral vascular protection by erythropoietin." J Cereb Blood Flow Metab **23**(3): 320-30.
- Chong, Z. Z., F. Li, et al. (2005). "Erythropoietin requires NF-kappaB and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during beta-amyloid toxicity." Curr Neurovasc Res **2**(5): 387-99.
- Chong, Z. Z. and K. Maiese (2004). "Targeting WNT, protein kinase B, and mitochondrial membrane integrity to foster cellular survival in the nervous system." Histol Histopathol **19**(2): 495-504.
- Collins, A. J., J. Z. Ma, et al. (1998). "Trends in anemia treatment with erythropoietin usage and patient outcomes." Am J Kidney Dis **32**(6 Suppl 4): S133-41.
- Congote, L. F. (1977). "Regulation of fetal liver erythropoiesis." J Steroid Biochem **8**(5): 423-8.
- Corwin, H. L., A. Gettinger, et al. (2007). "Efficacy and safety of epoetin alfa in critically ill patients." N Engl J Med **357**(10): 965-76.
- Cosio, F. G., W. Qiu, et al. (1996). "Factors related to the donor organ are major determinants of renal allograft function and survival." Transplantation **62**(11): 1571-6.
- Cosman, D., S. D. Lyman, et al. (1990). "A new cytokine receptor superfamily." Trends Biochem Sci **15**(7): 265-70.
- D'Andrea, A. D., H. F. Lodish, et al. (1989). "Expression cloning of the murine erythropoietin receptor." Cell **57**(2): 277-85.
- D'Andrea, A. D., A. Yoshimura, et al. (1991). "The cytoplasmic region of the erythropoietin receptor contains nonoverlapping positive and negative growth-regulatory domains." Mol Cell Biol **11**(4): 1980-7.
- de Boer, J., J. De Meester, et al. (1999). "Eurotransplant randomized multicenter kidney graft preservation study comparing HTK with UW and Euro-Collins." Transpl Int **12**(6): 447-53.
- de la Chapelle, A., A. L. Traskelin, et al. (1993). "Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(10): 4495-9.
- de Vries, B., J. Kohl, et al. (2003). "Complement factor C5a mediates renal ischemia-reperfusion injury independent from neutrophils." J Immunol **170**(7): 3883-9.
- Depping, R., K. Kawakami, et al. (2005). "Expression of the erythropoietin receptor in human heart." J Thorac Cardiovasc Surg **130**(3): 877-8.
- DeVries, M. E., K. A. Hosiawa, et al. (2003). "The role of chemokines and chemokine receptors in alloantigen-independent and alloantigen-dependent transplantation injury." Semin Immunol **15**(1): 33-48.

-
- Digicaylioglu, M. and S. A. Lipton (2001). "Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades." Nature **412**(6847): 641-7.
- Donnahoo, K. K., X. Meng, et al. (1999). "Early kidney TNF-alpha expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion." Am J Physiol **277**(3 Pt 2): R922-9.
- Dragun, D., S. G. Tullius, et al. (1998). "ICAM-1 antisense oligodesoxynucleotides prevent reperfusion injury and enhance immediate graft function in renal transplantation." Kidney Int **54**(2): 590-602.
- Echigoya, M. H., K. Obikane, et al. (2005). "Glomerular localization of erythropoietin receptor mRNA and protein in neonatal and mature mouse kidney." Nephron Exp Nephrol **100**(1): e21-9.
- Edelstein, C. L., H. Ling, et al. (1997). "The nature of renal cell injury." Kidney Int **51**(5): 1341-51.
- Ehrenreich, H., B. Fischer, et al. (2007). "Exploring recombinant human erythropoietin in chronic progressive multiple sclerosis." Brain **130**(Pt 10): 2577-88.
- Ehrenreich, H., M. Hasselblatt, et al. (2002). "Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial." Mol Med **8**(8): 495-505.
- Ehrenreich, H., D. Hinze-Selch, et al. (2007). "Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin." Mol Psychiatry **12**(2): 206-20.
- Eklom, B. (1996). "Blood doping and erythropoietin. The effects of variation in hemoglobin concentration and other related factors on physical performance." Am J Sports Med **24**(6 Suppl): S40-2.
- Emami, A., J. H. Schwartz, et al. (1991). "Transient ischemia or heat stress induces a cytoprotectant protein in rat kidney." Am J Physiol **260**(4 Pt 2): F479-85.
- Espejo, B., A. Torres, et al. (2003). "Obesity favors surgical and infectious complications after renal transplantation." Transplant Proc **35**(5): 1762-3.
- Fagard, R., E. Bielen, et al. (1991). "Heritability of aerobic power and anaerobic energy generation during exercise." J Appl Physiol **70**(1): 357-62.
- Fernandez Rivera, C., A. Alonso Hernandez, et al. (2005). "Basiliximab (Simulect) in renal transplantation with high risk for delayed graft function." Transplant Proc **37**(3): 1435-7.
- Figuerola, Y. G., A. K. Chan, et al. (2002). "NF-kappaB plays a key role in hypoxia-inducible factor-1-regulated erythropoietin gene expression." Exp Hematol **30**(12): 1419-27.
- Finn, W. F., L. J. Hak, et al. (1987). "Protective effect of prostacyclin on postischemic acute renal failure in the rat." Kidney Int **32**(4): 479-87.

-
- Fiordaliso, F., S. Chimenti, et al. (2005). "A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(6): 2046-51.
- Fischereder, M., P. Gohring, et al. (1998). "Early loss of renal transplants in patients with thrombophilia." Transplantation **65**(7): 936-9.
- Furukawa, T., M. Narita, et al. (1997). "Primary familial polycythaemia associated with a novel point mutation in the erythropoietin receptor." Br J Haematol **99**(1): 222-7.
- Gjertson, D. W. (2000). "Impact of delayed graft function and acute rejection on kidney graft survival." Clin Transpl: 467-80.
- Grasso, G., M. Buemi, et al. (2002). "Beneficial effects of systemic administration of recombinant human erythropoietin in rabbits subjected to subarachnoid hemorrhage." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5627-31.
- Green, D. R. and G. Kroemer (2004). "The pathophysiology of mitochondrial cell death." Science **305**(5684): 626-9.
- Halloran, P. F. and L. G. Hunsicker (2001). "Delayed graft function: state of the art, November 10-11, 2000. Summit meeting, Scottsdale, Arizona, USA." Am J Transplant **1**(2): 115-20.
- Hamel, P., J. A. Simoneau, et al. (1986). "Heredity and muscle adaptation to endurance training." Med Sci Sports Exerc **18**(6): 690-6.
- Hariharan, S., C. P. Johnson, et al. (2000). "Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996." N Engl J Med **342**(9): 605-12.
- Harris, S., B. M. Coupes, et al. (2007). "TGF-beta1 in chronic allograft nephropathy following renal transplantation." J Nephrol **20**(2): 177-85.
- Haugen, E. and K. A. Nath (1999). "The involvement of oxidative stress in the progression of renal injury." Blood Purif **17**(2-3): 58-65.
- Hauser, P., C. Schwarz, et al. (2004). "Genome-wide gene-expression patterns of donor kidney biopsies distinguish primary allograft function." Lab Invest **84**(3): 353-61.
- Henry, D. H., G. N. Beall, et al. (1992). "Recombinant human erythropoietin in the treatment of anemia associated with human immunodeficiency virus (HIV) infection and zidovudine therapy. Overview of four clinical trials." Ann Intern Med **117**(9): 739-48.
- Hess, G., P. Rose, et al. (1994). "Molecular analysis of the erythropoietin receptor system in patients with polycythaemia vera." Br J Haematol **88**(4): 794-802.
- Hetzel, G. R., B. Klein, et al. (2002). "Risk factors for delayed graft function after renal transplantation and their significance for long-term clinical outcome." Transpl Int **15**(1): 10-6.

-
- Hilton, D. J., S. S. Watowich, et al. (1995). "Increased cell surface expression and enhanced folding in the endoplasmic reticulum of a mutant erythropoietin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(1): 190-4.
- Hladunewich, M. A., G. Corrigan, et al. (2003). "A randomized, placebo-controlled trial of IGF-1 for delayed graft function: a human model to study postischemic ARF." Kidney Int **64**(2): 593-602.
- Hocher, B., T. Slowinski, et al. (2002). "Association of factor V Leiden mutation with delayed graft function, acute rejection episodes and long-term graft dysfunction in kidney transplant recipients." Thromb Haemost **87**(2): 194-8.
- Hochhauser, E., O. Pappo, et al. (2008). "Recombinant human erythropoietin attenuates hepatic injury induced by ischemia/reperfusion in an isolated mouse liver model." Apoptosis **13**(1): 77-86.
- Hoffmann, S. C., R. L. Kampen, et al. (2002). "Molecular and immunohistochemical characterization of the onset and resolution of human renal allograft ischemia-reperfusion injury." Transplantation **74**(7): 916-23.
- Huang, C., C. Huang, et al. (2002). "The effect of endothelin antagonists on renal ischaemia-reperfusion injury and the development of acute renal failure in the rat." Nephrol Dial Transplant **17**(9): 1578-85.
- Huang, L. E., J. Gu, et al. (1998). "Regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 7987-92.
- Humar, A., T. Ramcharan, et al. (2002). "Risk factors for slow graft function after kidney transplants: a multivariate analysis." Clin Transplant **16**(6): 425-9.
- Ikeda, E. (2005). "Cellular response to tissue hypoxia and its involvement in disease progression." Pathol Int **55**(10): 603-10.
- Imamura, R., T. Moriyama, et al. (2007). "Erythropoietin protects the kidneys against ischemia reperfusion injury by activating hypoxia inducible factor-1 alpha." Transplantation **83**(10): 1371-9.
- Incagnoli, P., A. Ramond, et al. (2009). "Erythropoietin improved initial resuscitation and increased survival after cardiac arrest in rats." Resuscitation **80**(6): 696-700.
- Innis, M. A., K. B. Myambo, et al. (1988). "DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(24): 9436-40.
- Irish, W. D., D. A. McCollum, et al. (2003). "Nomogram for predicting the likelihood of delayed graft function in adult cadaveric renal transplant recipients." J Am Soc Nephrol **14**(11): 2967-74.

-
- Israni, A. K., N. Li, et al. (2008). "Association of donor inflammation- and apoptosis-related genotypes and delayed allograft function after kidney transplantation." Am J Kidney Dis **52**(2): 331-9.
- Jang, H. R., G. J. Ko, et al. (2009). "The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney." J Mol Med **87**(9): 859-64.
- Jeldres, C., H. Cardinal, et al. (2009). "Prediction of delayed graft function after renal transplantation." Can Urol Assoc J **3**(5): 377-82.
- Jelkmann, W. (1992). "Erythropoietin: structure, control of production, and function." Physiol Rev **72**(2): 449-89.
- Jelkmann, W. (2004). "Molecular biology of erythropoietin." Intern Med **43**(8): 649-59.
- Jiang, N., T. C. He, et al. (1996). "The box1 domain of the erythropoietin receptor specifies Janus kinase 2 activation and functions mitogenically within an interleukin 2 beta-receptor chimera." J Biol Chem **271**(28): 16472-6.
- Johnston, T. D., L. R. Thacker, et al. (2004). "Sensitivity of expanded-criteria donor kidneys to cold ischaemia time." Clin Transplant **18 Suppl 12**: 28-32.
- Jones, S. S., A. D. D'Andrea, et al. (1990). "Human erythropoietin receptor: cloning, expression, and biologic characterization." Blood **76**(1): 31-5.
- Juul, S. E., D. K. Anderson, et al. (1998). "Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system." Pediatr Res **43**(1): 40-9.
- Juul, S. E., A. T. Yachnis, et al. (1998). "Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus." Early Hum Dev **52**(3): 235-49.
- Juvonen, E., E. Ikkala, et al. (1991). "Autosomal dominant erythrocytosis caused by increased sensitivity to erythropoietin." Blood **78**(11): 3066-9.
- Kaminska, D., B. Tyran, et al. (2007). "Cytokine gene expression in kidney allograft biopsies after donor brain death and ischemia-reperfusion injury using in situ reverse-transcription polymerase chain reaction analysis." Transplantation **84**(9): 1118-24.
- Khuri, F. R. (2007). "Weighing the hazards of erythropoiesis stimulation in patients with cancer." N Engl J Med **356**(24): 2445-8.
- Kiley, S. C., B. A. Thornhill, et al. (2003). "Growth factor-mediated phosphorylation of proapoptotic BAD reduces tubule cell death in vitro and in vivo." Kidney Int **63**(1): 33-42.
- Klingmuller, U., S. Bergelson, et al. (1996). "Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8324-8.
- Koning, O. H., R. J. Ploeg, et al. (1997). "Risk factors for delayed graft function in cadaveric kidney transplantation: a prospective study of renal function and graft survival after

-
- preservation with University of Wisconsin solution in multi-organ donors. European Multicenter Study Group." Transplantation **63**(11): 1620-8.
- Kosieradzki, M. and W. Rowinski (2008). "Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention." Transplant Proc **40**(10): 3279-88.
- Koury, M. J. and M. C. Bondurant (1992). "The molecular mechanism of erythropoietin action." Eur J Biochem **210**(3): 649-63.
- Kralovics, R., K. Indrak, et al. (1997). "Two new EPO receptor mutations: truncated EPO receptors are most frequently associated with primary familial and congenital polycythemia." Blood **90**(5): 2057-61.
- Kruger, B., C. A. Boger, et al. (2007). "RANTES/CCL5 polymorphisms as a risk factor for recurrent acute rejection." Clin Transplant **21**(3): 385-90.
- Kruger, B., B. Schroppel, et al. (2002). "A Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) polymorphism and outcome after renal transplantation." J Am Soc Nephrol **13**(10): 2585-9.
- Kyllonen, L. E., K. T. Salmela, et al. (2000). "Long-term results of 1047 cadaveric kidney transplantations with special emphasis on initial graft function and rejection." Transpl Int **13**(2): 122-8.
- Lacombe, C., J. L. Da Silva, et al. (1988). "Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney." J Clin Invest **81**(2): 620-3.
- Lavoie, C., A. Diguët, et al. (1998). "Erythropoietin (rHuEPO) doping: effects of exercise on anaerobic metabolism in rats." Int J Sports Med **19**(4): 281-6.
- Law, M. L., G. Y. Cai, et al. (1986). "Chromosomal assignment of the human erythropoietin gene and its DNA polymorphism." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(18): 6920-4.
- Le Couedic, J. P., M. T. Mitjavila, et al. (1996). "Missense mutation of the erythropoietin receptor is a rare event in human erythroid malignancies." Blood **87**(4): 1502-11.
- Lebranchu, Y., J. M. Halimi, et al. (2005). "Delayed graft function: risk factors, consequences and parameters affecting outcome-results from MOST, A Multinational Observational Study." Transplant Proc **37**(1): 345-7.
- Lee, S. T., K. Chu, et al. (2006). "Erythropoietin reduces perihematoma inflammation and cell death with eNOS and STAT3 activations in experimental intracerebral hemorrhage." J Neurochem **96**(6): 1728-39.
- Lemos, F. B., J. N. Ijzermans, et al. (2003). "Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion." J Am Soc Nephrol **14**(12): 3278-87.
- Lesage, R., J. A. Simoneau, et al. (1985). "Familial resemblance in maximal heart rate, blood lactate and aerobic power." Hum Hered **35**(3): 182-9.

-
- Liao, Z. B., X. G. Zhi, et al. (2008). "Recombinant human erythropoietin administration protects cortical neurons from traumatic brain injury in rats." Eur J Neurol **15**(2): 140-9.
- Lin, F. K., S. Suggs, et al. (1985). "Cloning and expression of the human erythropoietin gene." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(22): 7580-4.
- Ling, H., C. Edelstein, et al. (1999). "Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice." Am J Physiol **277**(3 Pt 2): F383-90.
- Logar, C. M., P. T. Brinkkoetter, et al. (2007). "Darbepoetin alfa protects podocytes from apoptosis in vitro and in vivo." Kidney Int **72**(4): 489-98.
- Longmore, G. D. (1993). "Erythropoietin receptor mutations and Olympic glory." Nat Genet **4**(2): 108-10.
- Lundby, C., Y. Hellsten, et al. (2008). "Erythropoietin receptor in human skeletal muscle and the effects of acute and long-term injections with recombinant human erythropoietin on the skeletal muscle." J Appl Physiol **104**(4): 1154-60.
- Mahmud, D. L., G. A. M, et al. (2002). "Phosphorylation of forkhead transcription factors by erythropoietin and stem cell factor prevents acetylation and their interaction with coactivator p300 in erythroid progenitor cells." Oncogene **21**(10): 1556-62.
- Marcen, R., L. Orofino, et al. (1998). "Delayed graft function does not reduce the survival of renal transplant allografts." Transplantation **66**(4): 461-6.
- Martinez, F., N. Kamar, et al. (2010). "High dose epoetin beta in the first weeks following renal transplantation and delayed graft function: Results of the Neo-PDGF Study." Am J Transplant **10**(7): 1695-700.
- Matsuno, T., H. Sasaki, et al. (1996). "Apoptosis in human kidney allografts." Transplant Proc **28**(3): 1226-7.
- Maxwell, P. H., D. J. Ferguson, et al. (1994). "Expression of a homologously recombined erythropoietin-SV40 T antigen fusion gene in mouse liver: evidence for erythropoietin production by Ito cells." Blood **84**(6): 1823-30.
- Maxwell, P. H., M. S. Wiesener, et al. (1999). "The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis." Nature **399**(6733): 271-5.
- McKoy, J. M., R. E. Stonecash, et al. (2008). "Epoetin-associated pure red cell aplasia: past, present, and future considerations." Transfusion **48**(8): 1754-62.
- McLaren, B. K., P. L. Zhang, et al. (2004). "P53 protein is a reliable marker in identification of renal tubular injury." Appl Immunohistochem Mol Morphol **12**(3): 225-9.
- McTaggart, R. A., D. Gottlieb, et al. (2003). "Sirolimus prolongs recovery from delayed graft function after cadaveric renal transplantation." Am J Transplant **3**(4): 416-23.
- Mengozzi, M., R. Latini, et al. (2006). "Increased erythropoietin production after myocardial infarction in mice." Heart **92**(6): 838-9.

-
- Merion, R. M., H. K. Oh, et al. (1990). "A prospective controlled trial of cold-storage versus machine-perfusion preservation in cadaveric renal transplantation." Transplantation **50**(2): 230-3.
- Meyer T., K. W. (1999). "**Die „maximale Sauerstoffaufnahme“ ($VO_{2\max}$)**." Deutsche Zeitschrift Sportmedizin: 285-286.
- Mihov, D., J. Vogel, et al. (2009). "Erythropoietin activates nitric oxide synthase in murine erythrocytes." Am J Physiol Cell Physiol **297**(2): C378-88.
- Mittelman, M., J. Gardyn, et al. (1996). "Analysis of the erythropoietin receptor gene in patients with myeloproliferative and myelodysplastic syndromes." Leuk Res **20**(6): 459-66.
- Moers, C., J. M. Smits, et al. (2009). "Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation." N Engl J Med **360**(1): 7-19.
- Mohiuddin, M. K., L. El-Asir, et al. (2007). "Perioperative erythropoietin efficacy in renal transplantation." Transplant Proc **39**(1): 132-4.
- Monteiro, F., R. Buelow, et al. (1997). "Identification of patients at high risk of graft loss by pre- and posttransplant monitoring of anti-HLA class I IgG antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay." Transplantation **63**(4): 542-6.
- Moon, C., M. Krawczyk, et al. (2003). "Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11612-7.
- Moore, E. and R. Bellomo "Erythropoietin (EPO) in acute kidney injury." Ann Intensive Care **1**(1): 3.
- Nagai, A., E. Nakagawa, et al. (2001). "Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture." J Neuropathol Exp Neurol **60**(4): 386-92.
- Neusser, M., M. Tepel, et al. (1993). "Erythropoietin increases cytosolic free calcium concentration in vascular smooth muscle cells." Cardiovasc Res **27**(7): 1233-6.
- Noguchi, C. T., K. S. Bae, et al. (1991). "Cloning of the human erythropoietin receptor gene." Blood **78**(10): 2548-56.
- Noiri, E., A. Nakao, et al. (2001). "Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia." Am J Physiol Renal Physiol **281**(5): F948-57.
- Noiri, E., T. Peresleni, et al. (1996). "In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia." J Clin Invest **97**(10): 2377-83.
- Noreen, H. J., D. M. McKinley, et al. (2003). "Positive remote crossmatch: impact on short-term and long-term outcome in cadaver renal transplantation." Transplantation **75**(4): 501-5.
- Nosaka, T., T. Kawashima, et al. (1999). "STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells." Embo J **18**(17): 4754-65.

-
- Ogilvie, M., X. Yu, et al. (2000). "Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts." J Biol Chem **275**(50): 39754-61.
- Ojo, A. O., R. A. Wolfe, et al. (1997). "Delayed graft function: risk factors and implications for renal allograft survival." Transplantation **63**(7): 968-74.
- Okusa, M. D. (2002). "The inflammatory cascade in acute ischemic renal failure." Nephron **90**(2): 133-8.
- Olsen, N. V. (2003). "Central nervous system frontiers for the use of erythropoietin." Clin Infect Dis **37 Suppl 4**: S323-30.
- Oppenheimer, F., P. Aljama, et al. (2004). "The impact of donor age on the results of renal transplantation." Nephrol Dial Transplant **19 Suppl 3**: iii11-5.
- Ortiz, A., C. Lorz, et al. (2000). "Expression of apoptosis regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture or following acute renal failure." Kidney Int **57**(3): 969-81.
- Osslund, T. and R. Syed (2003). Structural basis for the signal transduction of erythropoietin in Erythropoietins and Erythropoiesis Molecular, Cellular, Preclinical and Clinical Biology, Birkhäuser Verlag Basel, Boston, Berlin.
- Pallet, N., N. Bouvier, et al. "Antiapoptotic properties of recombinant human erythropoietin protects against tubular cyclosporine toxicity." Pharmacol Res **61**(1): 71-5.
- Papayannopoulou T., A. J., D`Andrea A. (2000). Biology of erythropoiesis, erythroid differentiation and maturation. New York, Churchill Livingston.
- Parekh, J., A. Bostrom, et al. "Diabetes Mellitus: A Risk Factor for Delayed Graft Function after Deceased Donor Kidney Transplantation." Am J Transplant.
- Parikh, C. R., A. Jani, et al. (2004). "Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis." Am J Kidney Dis **43**(3): 405-14.
- Parzanese, I., D. Maccarone, et al. (2006). "Risk factors that can influence kidney transplant outcome." Transplant Proc **38**(4): 1022-3.
- Peeters, P., W. Tervyn, et al. (2004). "Delayed graft function in renal transplantation." Curr Opin Crit Care **10**(6): 489-98.
- Peeters, P. and R. Vanholder (2008). "Therapeutic interventions favorably influencing delayed and slow graft function in kidney transplantation: mission impossible?" Transplantation **85**(7 Suppl): S31-7.
- Percy, M. J. (2007). "Genetically heterogeneous origins of idiopathic erythrocytosis." Hematology **12**(2): 131-9.
- Percy, M. J., M. F. McMullin, et al. (1998). "Erythrocytosis due to a mutation in the erythropoietin receptor gene." Br J Haematol **100**(2): 407-10.
- Perico, N., D. Cattaneo, et al. (2004). "Delayed graft function in kidney transplantation." Lancet **364**(9447): 1814-27.

-
- Petersen, K. B., P. Hokland, et al. (2004). "Erythropoietin receptor defect: a cause of primary polycythaemia." Br J Haematol **125**(4): 537-8.
- Pfaff, W. W., R. J. Howard, et al. (1998). "Delayed graft function after renal transplantation." Transplantation **65**(2): 219-23.
- Philo, J. S., K. H. Aoki, et al. (1996). "Dimerization of the extracellular domain of the erythropoietin (EPO) receptor by EPO: one high-affinity and one low-affinity interaction." Biochemistry **35**(5): 1681-91.
- Pieringer, H. and G. Biesenbach (2005). "Risk factors for delayed kidney function and impact of delayed function on patient and graft survival in adult graft recipients." Clin Transplant **19**(3): 391-8.
- Ploeg, R. J., J. H. van Bockel, et al. (1992). "Effect of preservation solution on results of cadaveric kidney transplantation. The European Multicentre Study Group." Lancet **340**(8812): 129-37.
- Polyak, M. M., B. O. Arrington, et al. (2000). "The influence of pulsatile preservation on renal transplantation in the 1990s." Transplantation **69**(2): 249-58.
- Prud'homme, D., C. Bouchard, et al. (1984). "Sensitivity of maximal aerobic power to training is genotype-dependent." Med Sci Sports Exerc **16**(5): 489-93.
- Quiroga, I., P. McShane, et al. (2006). "Major effects of delayed graft function and cold ischaemia time on renal allograft survival." Nephrol Dial Transplant **21**(6): 1689-96.
- Reed, J. C. (2001). "Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery." Trends Mol Med **7**(7): 314-9.
- Ribatti, D., M. Presta, et al. (1999). "Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo." Blood **93**(8): 2627-36.
- Rives, S., H. L. Pahl, et al. (2007). "Molecular genetic analyses in familial and sporadic congenital primary erythrocytosis." Haematologica **92**(5): 674-7.
- Rodrigo, E., G. Fernandez-Fresnedo, et al. (2005). "Similar impact of slow and delayed graft function on renal allograft outcome and function." Transplant Proc **37**(3): 1431-2.
- Roecker, L., R. Kowoll, et al. (2006). "Observation of serum erythropoietin concentrations in female athletes for up to eight days after a marathon run." Clin Lab **52**(9-10): 511-3.
- Rosenberger, C., W. Griethe, et al. (2003). "Cellular responses to hypoxia after renal segmental infarction." Kidney Int **64**(3): 874-86.
- Rosenberger, C., J. Pratschke, et al. (2007). "Immunohistochemical detection of hypoxia-inducible factor-1alpha in human renal allograft biopsies." J Am Soc Nephrol **18**(1): 343-51.
- Rosenthal, J. T., G. M. Danovitch, et al. (1991). "The high cost of delayed graft function in cadaveric renal transplantation." Transplantation **51**(5): 1115-8.

- Rundqvist, H., E. Rullman, et al. (2009). "Activation of the erythropoietin receptor in human skeletal muscle." Eur J Endocrinol **161**(3): 427-34.
- Russell, G., C. J. Gore, et al. (2002). "Effects of prolonged low doses of recombinant human erythropoietin during submaximal and maximal exercise." Eur J Appl Physiol **86**(5): 442-9.
- Sakanaka, M., T. C. Wen, et al. (1998). "In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(8): 4635-40.
- Salahudeen, A. K., N. Haider, et al. (2008). "Antiapoptotic properties of erythropoiesis-stimulating proteins in models of cisplatin-induced acute kidney injury." Am J Physiol Renal Physiol **294**(6): F1354-65.
- Sanz, A. B., B. Santamaria, et al. (2008). "Mechanisms of renal apoptosis in health and disease." J Am Soc Nephrol **19**(9): 1634-42.
- Schlumpf, R., M. Weber, et al. (1996). "Transplantation of kidneys from non-heart-beating donors: protocol, cardiac death diagnosis, and results." Transplant Proc **28**(1): 107-9.
- Schmeding, M., U. P. Neumann, et al. (2007). "Erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury in the rat liver." Eur Surg Res **39**(3): 189-97.
- Schwandt, H. J., B. Heyduck, et al. (1991). "Influence of prolonged physical exercise on the erythropoietin concentration in blood." Eur J Appl Physiol Occup Physiol **63**(6): 463-6.
- Schwarz, C., P. Hauser, et al. (2002). "Failure of BCL-2 up-regulation in proximal tubular epithelial cells of donor kidney biopsy specimens is associated with apoptosis and delayed graft function." Lab Invest **82**(7): 941-8.
- Seegerer, S., P. J. Nelson, et al. (2000). "Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies." J Am Soc Nephrol **11**(1): 152-76.
- Sehirli, A. O., G. Sener, et al. (2003). "Protective effect of N-acetylcysteine on renal ischemia/reperfusion injury in the rat." J Nephrol **16**(1): 75-80.
- Senel, F. M., H. Karakayali, et al. (1998). "Delayed graft function: predictive factors and impact on outcome in living-related kidney transplantations." Ren Fail **20**(4): 589-95.
- Sepodes, B., R. Maio, et al. (2006). "Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat." Transpl Int **19**(11): 919-26.
- Sharples, E. J., N. Patel, et al. (2004). "Erythropoietin protects the kidney against the injury and dysfunction caused by ischemia-reperfusion." J Am Soc Nephrol **15**(8): 2115-24.
- Sheridan, A. M. and J. V. Bonventre (2000). "Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure." Curr Opin Nephrol Hypertens **9**(4): 427-34.
- Shilliday, I. R. and M. Sherif (2007). "Calcium channel blockers for preventing acute tubular necrosis in kidney transplant recipients." Cochrane Database Syst Rev(4): CD003421.

-
- Siren, A. L., F. Knerlich, et al. (2001). "Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain." Acta Neuropathol **101**(3): 271-6.
- Smith, K. D., L. E. Wrenshall, et al. (2003). "Delayed graft function and cast nephropathy associated with tacrolimus plus rapamycin use." J Am Soc Nephrol **14**(4): 1037-45.
- Snoeijs, M. G., L. W. van Heurn, et al. "Biological modulation of renal ischemia-reperfusion injury." Curr Opin Organ Transplant **15**(2): 190-9.
- Snyder, J. J., B. L. Kasiske, et al. (2002). "A comparison of transplant outcomes in peritoneal and hemodialysis patients." Kidney Int **62**(4): 1423-30.
- Sokol, L., M. Luhovy, et al. (1995). "Primary familial polycythemia: a frameshift mutation in the erythropoietin receptor gene and increased sensitivity of erythroid progenitors to erythropoietin." Blood **86**(1): 15-22.
- Sokol, L., J. F. Prchal, et al. (1994). "Mutation in the negative regulatory element of the erythropoietin receptor gene in a case of sporadic primary polycythemia." Exp Hematol **22**(5): 447-53.
- Solez, K., L. C. Racusen, et al. (1993). "Morphology of ischemic acute renal failure, normal function, and cyclosporine toxicity in cyclosporine-treated renal allograft recipients." Kidney Int **43**(5): 1058-67.
- Somervaille, T. C., D. C. Linch, et al. (2001). "Growth factor withdrawal from primary human erythroid progenitors induces apoptosis through a pathway involving glycogen synthase kinase-3 and Bax." Blood **98**(5): 1374-81.
- Spandou, E., I. Tsouchnikas, et al. (2006). "Erythropoietin attenuates renal injury in experimental acute renal failure ischaemic/reperfusion model." Nephrol Dial Transplant **21**(2): 330-6.
- Springborg, J. B., X. Ma, et al. (2002). "A single subcutaneous bolus of erythropoietin normalizes cerebral blood flow autoregulation after subarachnoid haemorrhage in rats." Br J Pharmacol **135**(3): 823-9.
- St Peter, S. D., C. J. Imber, et al. (2002). "Genetic determinants of delayed graft function after kidney transplantation." Transplantation **74**(6): 809-13.
- Sterin-Borda, L., A. C. Barcelo, et al. (2003). "Erythropoietin improves cardiac contractility in post-hypoxic mice." Br J Haematol **121**(1): 180-6.
- Strunk, T., C. Hartel, et al. (2008). "Erythropoietin inhibits cytokine production of neonatal and adult leukocytes." Acta Paediatr **97**(1): 16-20.
- Supavekin, S., W. Zhang, et al. (2003). "Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion." Kidney Int **63**(5): 1714-24.
- Swanson, S. J., I. O. Hypolite, et al. (2002). "Effect of donor factors on early graft survival in adult cadaveric renal transplantation." Am J Transplant **2**(1): 68-75.

-
- Tanabe, K., T. Oshima, et al. (1998). "Long-term renal function in on-heart-beating donor kidney transplantation: a single-center experience." Transplantation **66**(12): 1708-13.
- Tapiawala, S. N., K. J. Tinckam, et al. (2010). "Delayed graft function and the risk for death with a functioning graft." J Am Soc Nephrol **21**(1): 153-61.
- Tejani, A. H., E. K. Sullivan, et al. (1999). "Predictive factors for delayed graft function (DGF) and its impact on renal graft survival in children: a report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study (NAPRTCS)." Pediatr Transplant **3**(4): 293-300.
- Thomas, M. C., T. H. Mathew, et al. (2003). "Perioperative blood pressure control, delayed graft function, and acute rejection after renal transplantation." Transplantation **75**(12): 1989-95.
- Troppmann, C., K. J. Gillingham, et al. (1996). "Delayed graft function in the absence of rejection has no long-term impact. A study of cadaver kidney recipients with good graft function at 1 year after transplantation." Transplantation **61**(9): 1331-7.
- Tsai, P. T., J. J. Ohab, et al. (2006). "A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery." J Neurosci **26**(4): 1269-74.
- Tullius S.G., P. R., Neuhaus P. (2001). Nierentransplantation, de Gruyter.
- van der Meer, P., E. Lipsic, et al. (2005). "Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction." J Am Coll Cardiol **46**(1): 125-33.
- Vaziri, N. D., X. J. Zhou, et al. (1994). "Erythropoietin enhances recovery from cisplatin-induced acute renal failure." Am J Physiol **266**(3 Pt 2): F360-6.
- Villa, P., P. Bigini, et al. (2003). "Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis." J Exp Med **198**(6): 971-5.
- Vogel, V., H. J. Kramer, et al. (1997). "Effects of erythropoietin on endothelin-1 synthesis and the cellular calcium messenger system in vascular endothelial cells." Am J Hypertens **10**(3): 289-96.
- Voors, A. A., A. M. Belonje, et al. "A single dose of erythropoietin in ST-elevation myocardial infarction." Eur Heart J.
- Wagner, M., P. Cadetg, et al. (2003). "Heme oxygenase-1 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and improves survival in rat renal allografts." Kidney Int **63**(4): 1564-73.
- Wang, G. L. and G. L. Semenza (1995). "Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1." J Biol Chem **270**(3): 1230-7.

-
- Wang, Y., Z. G. Zhang, et al. (2007). "Post-ischemic treatment with erythropoietin or carbamylated erythropoietin reduces infarction and improves neurological outcome in a rat model of focal cerebral ischemia." Br J Pharmacol **151**(8): 1377-84.
- Watowich, S. S., D. J. Hilton, et al. (1994). "Activation and inhibition of erythropoietin receptor function: role of receptor dimerization." Mol Cell Biol **14**(6): 3535-49.
- Watowich, S. S., X. Xie, et al. (1999). "Erythropoietin receptor mutations associated with familial erythrocytosis cause hypersensitivity to erythropoietin in the heterozygous state." Blood **94**(7): 2530-2.
- Weinberg, J. M. (1991). "The cell biology of ischemic renal injury." Kidney Int **39**(3): 476-500.
- Wen, D., J. P. Boissel, et al. (1993). "Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals." Blood **82**(5): 1507-16.
- Westenbrink, B. D., E. Lipsic, et al. (2007). "Erythropoietin improves cardiac function through endothelial progenitor cell and vascular endothelial growth factor mediated neovascularization." Eur Heart J **28**(16): 2018-27.
- Westenfelder, C. (2002). "Unexpected renal actions of erythropoietin." Exp Nephrol **10**(5-6): 294-8.
- Westenfelder, C., D. L. Biddle, et al. (1999). "Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors." Kidney Int **55**(3): 808-20.
- Winkelmann, J. C., L. A. Penny, et al. (1990). "The gene for the human erythropoietin receptor: analysis of the coding sequence and assignment to chromosome 19p." Blood **76**(1): 24-30.
- Witthuhn, B. A., F. W. Quelle, et al. (1993). "JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin." Cell **74**(2): 227-36.
- Wolfarth B, S. J., Jakob E, Boulay MR, Chagnon YC, Perusse L, Dionne FT, Gagnon J, Keul J, Bouchard C (1997). "Association between a tetranucleotide (GGAA)_n repeat in the erythropoietin receptor gene and endurance performance." Med Sci Sports Exerc.
- Wu, Y., Y. Shang, et al. (2007). "Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3 β /caspase-3 mediated signaling pathway." Apoptosis **12**(8): 1365-75.
- Xu, X., Z. Cao, et al. (2009). "Carbamylated erythropoietin protects the myocardium from acute ischemia/reperfusion injury through a PI3K/Akt-dependent mechanism." Surgery **146**(3): 506-14.
- Yang, C. W., C. Li, et al. (2003). "Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney." Faseb J **17**(12): 1754-5.

- Yarlagadda, S. G., S. G. Coca, et al. (2009). "Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis." Nephrol Dial Transplant **24**(3): 1039-47.
- Yarlagadda, S. G., S. G. Coca, et al. (2008). "Marked variation in the definition and diagnosis of delayed graft function: a systematic review." Nephrol Dial Transplant **23**(9): 2995-3003.
- Yoshimura, A., G. Longmore, et al. (1990). "Point mutation in the exoplasmic domain of the erythropoietin receptor resulting in hormone-independent activation and tumorigenicity." Nature **348**(6302): 647-9.
- Yoshimura, A., T. Zimmers, et al. (1992). "Mutations in the Trp-Ser-X-Trp-Ser motif of the erythropoietin receptor abolish processing, ligand binding, and activation of the receptor." J Biol Chem **267**(16): 11619-25.
- Younossi, Z. M., F. H. Nader, et al. (2008). "A phase II dose finding study of darbepoetin alpha and filgrastim for the management of anaemia and neutropenia in chronic hepatitis C treatment." J Viral Hepat **15**(5): 370-8.
- Yu, X., C. S. Lin, et al. (2001). "The human erythropoietin receptor gene rescues erythropoiesis and developmental defects in the erythropoietin receptor null mouse." Blood **98**(2): 475-7.
- Zhang, F., S. Wang, et al. (2007). "Signal transducers and activators of transcription 5 contributes to erythropoietin-mediated neuroprotection against hippocampal neuronal death after transient global cerebral ischemia." Neurobiol Dis **25**(1): 45-53.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktive Warteliste und Nierentransplantation(Grafik DSO, Quelle Eurotransplant)	3
Abbildung 2: Abhängigkeit von der kalten Ischämiezeit (Kyllonen, Salmela et al. 2000).....	9
Abbildung 3: Die zwei Formen des Erythropoietin- Receptors: auf der linken Seite (a) dargestellt ist das EPOR- Dimer, wie es in hämatopoetischen Zellen angenommen wird; auf der rechten Seite dargestellt ist das vorgeschlagene Modell eines gewebeschtützenden EPO- Rezeptors: dabei ist jedes EPOR Monomer mit einer β cR Untereinheit über eine Cystinverbindung verknüpft; Nach Bindung von EPO kommt es in beiden Rezeptoren zur Konformationsänderung mit Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade(Brines and Cerami 2008)	20
Abbildung 4: Zelluläre Kaskade (nach Maiese, Li et al. 2005)	22
Abbildung 5: (Chatterjee 2005)	24
Abbildung 6 PCR Produkte der Exons.....	38
Abbildung 7: Beispiel einer DNA- Sequenz	40
Abbildung 8: linke Seite: Abbildung der Wildtyp Sequenz, rechte Seite: heterozygoter Austausch von Guanin zu Adenin.....	50
Abbildung 9: Dargestellt ist das EPOR Dimer mit Bindung eines EPO Moleküls, gelb markiert sind die beiden Aminosäure Glycin(Gly46), hier findet sich die gefundene Sequenzvariation auf Exon 2, Gly 46 liegt direkt neben der Alpha- Helix des EPOR Monomers.....	54
Abbildung 10 des Restriktionsverdaus von Exon 2 mit Apal	55
Abbildung 11 zeigt auf der linken Seite die Sequenz des Wildtyps, auf der rechten Seite ist die heterozygote Variation mit Austausch von Adenin zu Guanin dargestellt	62
Abbildung 12 zeigt die Tertiärstruktur der beiden EPOR-Monomere mit Bindung eines EPO Moleküls, gelb markiert ist die Aminosäure Histidin 161 des Exon 4 in der sich eine heterozygote Sequenzvariation mit Austausch zu Arginin fand;.....	65
Abbildung 13 zeigt einen Restriktionsverdaus mit Not I, durch die heterozygote Variation(ganz rechts) kommt es zur Entstehung einer zusätzlichen Schnittstelle innerhalb der Sequenz, diese führt zu zwei zusätzlichen Banden mit der Größe von 399bp und 299bp;.....	66
Abbildung 14: Zusammenfassung der potentiellen Einflüsse von Erythropoietin	85
Abbildung 15: (Sanz, Santamaria et al. 2008)	91

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mit der familiären Erythrozytose assoziierte EPOR Mutationen (Percy 2007).....	30
Tabelle 2: PCR Bedingungen.....	36
Tabelle 3: Verwendete Primer.....	37
Tabelle 4: Ablauf der Sequenzreaktion.....	41
Tabelle 5: Verwendete Restriktionsenzyme.....	42
Tabelle 6: Verwendete Geräte.....	44
Tabelle 7: Daten des Nierenspenderkollektivs.....	46
Tabelle 8: Daten des Nierenempfängerkollektivs.....	46
Tabelle 9: Risikofaktoren für das Auftreten einer Delayed Graft Function.....	47
Tabelle 10: Einfluss einer DGF auf den klinischen Verlauf.....	48
Tabelle 11: Sequenzalignment im Bereich der Sequenzvariation im Exon 2, die Aminosäure Glycin (blau markiert) ist unter den einzelnen Säugetierspezies hoch konserviert, Sequenzen wurden aus der Datenbank der NCBI geladen (Accessionnummer angegeben).....	51
Tabelle 12: Abstandsmatrix EPOR.....	52
Tabelle 13: Abstandsmatrix Exon 2.....	53
Tabelle 14: Daten der beiden transplantierten Nieren des Indexspenders.....	56
Tabelle 15: Vergleich der klinischen Daten der Nieren der Wildtypspender mit den Nieren Spender mit gefundener Mutation.....	58
Tabelle 16: Kontrollkollektiv.....	60
Tabelle 17: Thrombophiliekollektiv.....	60
Tabelle 18: Heterozygote Träger.....	61
Tabelle 19: Sequenzalignment im Bereich der Sequenzvariation im Exon 4, die Aminosäure Histidin (blau markiert) ist unter den einzelnen Säugetierspezies hoch konserviert.....	63
Tabelle 20: Abstandsmatrix Exon 4.....	64
Tabelle 21: Genotyp.....	66
Tabelle 22: Daten der Index Spender.....	67
Tabelle 23: Vergleich der Nierentransplantate.....	67

9 Abkürzungsverzeichnis

ANP Atrial natriuretic peptide
APAF Apoptotic protease activating factor 1
AS Aminosäuren
ATP Adenosintriphosphat
Bcl B Cell Lymphoma
BFU- E Burst forming units erythroid
CAN Chronic Allograft Nephropathy
CEPO Carbamyliertes Erythropoietin
CFU Colony forming units
CIT Cold Ischemia Time, kalte Ischämiezeit
CXCR Chemokine receptor
DGF Delayed Graft Function
DNA Desoxyribonucleinacid
dATP Desoxyadenosintriphosphat
dCTP Desoxycytidintriphosphat
dGTP Desoxyguanosintriphosphat
dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphate
dTTP Desoxythymidintriphosphat
DSO Deutsche Stiftung Organtransplantation
ECD Extended criteria donors
EDTA Ethylendiamintetraacetat,
EGF Epidermal growth factor
eNOS endothelial Nitridoxid Synthase
EPC endothelial Progenitor Cell
EPO Erythropoietin
EPOR Erythropoietin Rezeptor
FOXO Forkhead Box Protein
GFR Glomeruläre Filtrationsrate
G- CSF Granulocyte colony stimulating factor
GM- CSF Granulocyte macrophage colony- stimulating factor
GSK-3beta Glycogen Synthase Kinase 3 beta
HBD Heart Beating Donors

HGF Hepatocyte growth factor
HIF Hypoxie inducible factor
HLA Humanes Leukozyten Antigen
HO- 1 Hämoxygenase- 1
HRE Hypoxia responsible element
HSP Heat Shock Protein
HTK Lösung Histidin- Tryptophan- Ketoglutarat Lösung
HZV Herzzeitvolumen
ICAM-1 Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN gamma Interferon gamma
IGF Immediate Graft Function
IGF- 1 Insulin Like Growth Factor 1
IL Interleukin
I/R Ischämie/ Reperfusionsschaden
JAK 2 Janus family tyrosine protein kinase 2
MCP-1 Monocyten Chemoattractan Protein 1
MDRD Modifikation of Diet in Renal Disease
MPO Myeloperoxidase
mRNA messenger Ribonucleinacid
m-TOR Mechanistic Target of Rapamycin
NF kB Nuclear Factor kappa B
NHBD Non Heart Beating Donors
NIHSS National Institutes of Health Stroke Scale
NMDA N-Methyl-D-aspartate
NO Stickstoffmonoxid
ODD oxygen-dependent domain
PCR Polymerase chain reaction
PDGF Platelet derived growth factor
PFCP Primäre familiäre congenitale Polyzythämie
PHD Prolyl hydroxylase domain
PI3-K Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKB Proteinkinase B
PRA Panel reactive antibodies
RANTES regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RFLP Restriktionsfragmentlängen-polymorphismus
ROS Reactive Oxygen Species

SGF Slow Graft Function
SNP Single nucleotide polymorphism
STAT Signal Transducer and Activator of Transcription
Taq Polymerase Thermophilus aquaticus Polymerase
TGF beta Transforming growth factor beta
TNF α Tumor Nekrose Faktor alpha
UW Lösung University of Wisconsin Lösung
VEGF Vascular Endothelial Growth Factor
VO2 max maximale Sauerstoffaufnahme
XIAP X-linked inhibitor of apoptosis protein

Lebenslauf

Danksagung

Folgenden Personen gilt mein besonderer Dank.

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Professor Michael Fischereider für die Überlassung der Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft, seine zahlreichen Ideen und zuletzt auch für die aufgebrauchte Geduld sehr herzlich bedanken.

Weiterhin gilt mein großer Dank Herrn Professor Peter Lohse und seiner Frau Pia, die mich in das experimentelle Arbeiten eingewiesen haben, und während meiner Laborzeit immer für jegliche erdenkliche Fragen zur Verfügung standen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Bernd Wohlfarth, der mir die Möglichkeit gegeben hat, die experimentellen Arbeiten an seinem Institut mit dem zur Verfügung stehenden Kollektiv fortzusetzen.

Nicht zuletzt möchte ich mich auf das allerherzlichste bei meiner Frau Betina bedanken, ohne die diese Arbeit wahrscheinlich nie fertig gestellt worden wäre. Danke für Deinen nie endenden Ansporn und viel Geduld!

Mama und Rolf, Euch gilt mein besonderer Dank für Eure immer fortwährende Unterstützung in den letzten Jahren und Jahrzehnten.

Henri und Anton, ihr beide bereichert mit Eurer guten Laune jeden Tag.

Eidesstattliche Versicherung

Friedrich, Sascha

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Prädiktion der Delayed Graft Function-
Genetische Untersuchungen
des Erythropoietinrezeptors**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand